

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Modificaciones de la radiosensibilidad en macromoléculas de
interés biológico : estudio aplicado al DNA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Gustavo Cobreros Mendazona

DIRECTOR:

María del Consuelo López Zumel

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322354718

**MODIFICADORES DE LA RADIOSENSIBILIDAD
EN MACROMOLECULAS DE INTERES BIOLOGICO.
ESTUDIO APLICADO AL DNA.**

616343372

35057981

MEMORIA

que presenta

GUSTAVO COBREROS MENDAZONA

para aspirar al

GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro ...3.23.13.....

Instituto de Química-Física «Rocasolano» (C.S.I.C.)

Sección de Radiobiología

Madrid, Noviembre de 1978

Nire gurasoei.

Este trabajo ha sido realizado en la Sección de Radiobiología del Instituto de Química-Física "Rocasolano", del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Quiero dedicar mi más sincero agradecimiento a la Dra. M^a Consuelo López Zumel, Investigador Científico, por haber aceptado la dirección de esta tesis, y, sobre todo, por la inestimable ayuda científica y humana que en todo momento se ha prestado a ofrecerme.

Agradezco a la Dra. Pilar Usobiaga Altuna, Investigador Científico, haber aceptado la colaboración en la dirección de este trabajo, asesorando los principales aspectos de la parte experimental.

Deseo agradecer a la Dra. María D. Astudillo las facilidades que desde el primer momento me ofreció para trabajar en esta Sección, así como su constante estímulo; a los Profesores de Investigación Dr. J.M. Gamboa y Dr. A. Albert por haberme permitido trabajar en sus Departamentos, y al Dr. C.A. Dávila, Jefe del Grupo de Biofísica de la Junta de Energía Nuclear, por lo que han supuesto los conocimientos adquiridos en su laboratorio y en sus clases teóricas.

De una forma especial quiero recordar a mis amigos los Doctores: Javier Avilés, Teófilo Díez-Caballero, José Luis Jorcano, M^a Victoria Alvarez, Fernando Garcés y Francisco Mingot, por sus valiosas sugerencias en distintos aspectos del trabajo, así como al Dr. Vicente Menéndez, por su paciente e insustituible ayuda en la elaboración de los programas de cálculo. Ha sido importante también la colaboración de Irene Romo, Gloria Pinillos, Isabel Delgado, Jesús Hernández, Pedro Navarrete y Esiquio Arranz.

Por último, mi más sincera expresión de estima a mis compañeros de laboratorio y de Instituto, que tanto han contribuido a que la estancia fuera más grata, y en quienes he encontrado grandes amigos.

INDICE

	pág.
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1. FINALIDAD DEL TRABAJO.....	2
1.2. INTERACCION RADIACION-MATERIA....	6
1.2.1. <u>Radiación corpuscular</u>	7
1.2.1.1. Con carga eléctrica.....	7
1.2.1.2. Sin carga eléctrica (neutrones)..	7
1.2.2. <u>Radiación electromagnética</u>	8
1.2.2.1. Interacción de las diferentes zonas del espectro electromagnético con la materia.....	8
1.2.2.2. Radiación electromagnética ionizante.....	11
1.2.3. <u>Ecuación de Bethe-Bloch</u>	14
1.3. INTERACCION RADIACION IONIZANTE-DNA.....	19
1.3.1. <u>Radicales inducidos en el H₂O</u>	23
1.3.2. <u>Acción de los radicales sobre la molécula de DNA</u>	28

	pág.
1.3.2.1. Alteraciones en las bases.....	30
1.3.2.2. Rupturas simples de cadena.....	32
1.3.2.3. Rupturas dobles de cadena.....	38
1.3.2.4. Enlaces cruzados.....	42
1.4. MODIFICADORES DEL EFECTO DE LA RA- DIACION.....	45
1.4.1. <u>Daunomicina</u>	50
1.4.2. <u>Cromomicina A₃</u>	53
1.4.3. <u>Antramicina</u>	55
1.4.4. <u>cis-diclorodiaminplatino (II)</u>	57
1.4.5. <u>Mitomicina C</u>	60
1.4.6. <u>Cloroquina</u>	61
II. <u>MATERIALES Y METODOS, EXPERIMENTALES</u> <u>Y DE CALCULO</u>	64
2.1. TRATAMIENTOS BASICOS DEL DNA.....	65
2.1.1. <u>Obtención y aislamiento</u>	65
2.1.2. <u>Conservación y disolución</u>	66
2.1.3. <u>Desnaturalización</u>	68
2.2. MODIFICADORES DEL EFECTO DE LA RA-	

	pág.
DIACION.....	70
2.2.1. <u>Daunomicina</u>	70
2.2.2. <u>Cromomicina A₃</u>	71
2.2.3. <u>Antramicina</u>	72
2.2.4. <u>cis-diclorodiaminplatino (II)</u>	73
2.2.5. <u>Mitomicina C</u>	74
2.2.6. <u>Cloroquina</u>	75
2.3. IRRADIACION DE LAS MUESTRAS.....	77
2.3.1. <u>Condiciones de la irradiación</u>	77
2.3.2. <u>Dosimetría</u>	78
2.4. TECNICAS DE MEDIDA.....	79
2.4.1. <u>Ultracentrifugación analítica</u>	79
2.4.1.1. Condiciones de centrifugación...	79
2.4.1.2. Cálculo de coeficientes de sedi- mentación.....	81
2.4.1.3. Cálculo de distribuciones y pro- medios de masa molecular.....	87
2.4.1.4. Cálculos de rupturas y enlaces cruzados.....	93

	pág.
2.4.2. <u>Espectrofotometría</u>	94
2.5. PROGRAMAS DE CALCULO.....	96
2.5.1. <u>Programa para el cálculo de coeficien-</u> <u>tes de sedimentación</u>	96
2.5.2. <u>Programa para el cálculo de distribucio-</u> <u>nes, promedios de masa molecular, rup-</u> <u>turas y enlaces cruzados</u>	99
2.5.3. <u>Programa auxiliar</u>	103
III. <u>PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTA-</u> <u>DOS</u>	104
3.1. CARACTERIZACION DEL DNA.....	105
3.1.1. <u>Coeficientes de sedimentación</u>	105
3.1.1.1. DNA nativo.....	108
3.1.1.2. DNA desnaturalizado.....	110
3.1.2. <u>Distribuciones y masas moleculares</u> ...	111
3.1.2.1. DNA nativo.....	113
3.1.2.2. DNA desnaturalizado.....	118
3.2. RADIOSENSIBILIDAD DEL DNA.....	125
3.2.1. <u>Influencia de la concentración sobre la</u>	

	pág.
<u>sedimentación de muestras irradiadas..</u>	125
3.2.2. <u>Efecto de diferentes dosis de radiación</u>	
<u>sobre el DNA.....</u>	129
3.2.2.1. Rupturas dobles.....	129
3.2.2.2. Rupturas simples.....	135
3.3. MODIFICADORES DEL EFECTO DE LA RA-	
DIACION.....	139
3.3.1. <u>Daunomicina.....</u>	139
3.3.2. <u>Cromomicina A₃.....</u>	147
3.3.3. <u>Antramicina.....</u>	156
3.3.4. <u>cis-diclorodiaminplatino (II).....</u>	165
3.3.5. <u>Mitomicina C.....</u>	169
3.3.6. <u>Cloroquina.....</u>	179
IV. <u>CONCLUSIONES.....</u>	188
V. <u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	194
VI. <u>APENDICES.....</u>	209

I. INTRODUCCION

1.1. FINALIDAD DEL TRABAJO

En la mayor parte de los casos de procesos cancerosos se suele emplear la radiación como tratamiento terapéutico, lográndose en algunos de ellos incluso la curación mediante la aplicación exclusiva de este procedimiento. Contrariamente a lo que se cree con frecuencia, los casos curados con radioterapia siguen en número a los de enfermos recuperados por intervención quirúrgica, y exceden en mucho a los casos de curación registrados empleando otros tratamientos.

Es opinión generalizada entre los radioterapeutas que pequeños incrementos en la radiosensibilidad diferencial del tejido tumoral frente al tejido sano aumentarían considerablemente la posibilidad de controlar los tumores incipientes y favorecerían la capacidad de tratar con efectividad los procesos metastásicos en Medicina. La razón de este supuesto estriba en que el uso de la radioterapia está limitado por las dosis de radiación que se pueden suministrar, debido al peligro que ello supone para los tejidos normales que se encuentran próximos o inevitablemente interpuestos en el volumen irradiado. Contribuye incluso de una forma negativa en este problema el hecho frecuentemente observado de que las células tumorales, por encontrarse en condiciones de hipoxia, presentan una resistencia mayor a la radiación que las células normales bien oxigenadas.

En principio, hay dos posibilidades que, bien de una forma alternativa, o bien, en el caso más optimista, aplicándolas conjuntamente, darían lugar a que se produjera por medios químicos el deseado incremento.

to de la radiosensibilidad diferencial en los tejidos y, como consecuencia de ello, la aplicación de dosis de radiación más bajas. Estas dos posibilidades son: 1) reducción selectiva de la radiosensibilidad de las células sanas mediante radioprotectores químicos; 2) incremento de la radiosensibilidad de los tejidos malignos con radiosensibilizantes que no influyan en las células sanas. En ambos casos se trata, por consiguiente, de modificar convenientemente la radiosensibilidad celular, campo en el que se viene investigando intensamente en los últimos años.

Fruto de estos estudios es el descubrimiento de varios productos, algunos de los cuales se están aplicando actualmente en clínica: metotrexato, ciclofosfamida, flagil, etc.. No obstante, ciertas características tales como elevada toxicidad, dificultades de solubilización y otros problemas que suelen presentar estos compuestos obligan a continuar en la búsqueda de nuevos modificadores de los efectos de la radiación que resulten más convenientes.

Una de las directrices seguidas en este empeño es la de ensayar con productos que ya se hayan manifestado como citotóxicos o antitumorales. En esta línea se encuentra precisamente la idea que promovió el presente trabajo: ensayar diversos productos como posibles modificadores de la radiosensibilidad de sistemas biológicos. Se eligió para ello la molécula de DNA como objeto fundamental de estudio por ser la principal responsable de los daños producidos por la radiación en los seres vivos. Como posibles modificadores se eligieron: un agente antimetabólico, diferentes antibióticos y un complejo inorgánico de platino, por ser compuestos que, según la información bibliográfica, resultan prototípicos de distintas maneras de unión al

DNA, y porque además, existían sobre ellos datos relativos a propiedades antitumorales o de radiación a otros niveles de estructuración biológica que sugerían la posibilidad de que se comportaran como modificadores de la radiosensibilidad del DNA, más concretamente, como sensibilizantes.

Las técnicas experimentales utilizadas fueron fundamentalmente químico-físicas, dada la ubicación de los laboratorios en que se realizó el trabajo y los medios de que se dispuso, teniendo en cuenta, no obstante, que estuvieran entre las más adecuadas al estudio propuesto.

Se eligió como técnica experimental básica la ultracentrifugación analítica, empleando el método de velocidad de sedimentación para, una vez observadas las variaciones de masa molecular, calcular el número de rupturas de cadenas inducidas en el DNA por efecto de la radiación. Esta técnica, frente a la viscosimetría, por ejemplo, presenta ciertas ventajas: por una parte, acusa una menor influencia de los cambios de flexibilidad aparecidos en el DNA nativo como consecuencia de las rupturas simples de cadena; por otra parte, si bien de las medidas de viscosidad se pueden deducir valores medios de masa molecular, no es posible hacer estudios detallados de distribuciones de masa molecular sin recurrir al laborioso e impreciso fraccionamiento de la muestra. Se empleó también la espectrofotometría para comprobar la formación de complejos entre los compuestos ensayados y el DNA, así como para estudiar el efecto de la radiación sobre las especies separadas o formando complejo. Finalmente, en cuanto al tipo de radiación, se eligieron los rayos X, debido a que, además de presentar características cualitativas similares a la radiación γ ,

y emplearse asimismo en radioterapia, resultó ser la fuente de radiación a la que se tuvo más fácil acceso en la Junta de Energía Nuclear.

A continuación, y antes de presentar los resultados experimentales obtenidos, se hace una exposición teórica resumida de los puntos que se consideran necesarios para entender mejor el trabajo, y la explicación detallada de los materiales y métodos empleados.

1.2. INTERACCION RADIACION-MATERIA

Los fenómenos de interacción entre los distintos tipos de radiación corpuscular o electromagnética y un sistema material son, obviamente, de una gran complejidad, por lo que, tanto su estudio como su exposición, exceden los límites de este trabajo.

No obstante, resulta de interés hacer aquí una breve exposición de conjunto en relación con las características que presentan los procesos primarios de transferencia de energía en los diferentes casos que se pueden presentar de interacción radiación-materia.

Por una parte, ello va a proporcionar una visión global del fenómeno, pudiendo así situar mejor, dentro del contexto general, el caso particular de la interacción rayos X-DNA, que es el que concierne a este trabajo. Por otra parte, esta exposición revelará que, siempre que se trate de radiaciones ionizantes, los procesos primarios implicados en la interacción son siempre los mismos, pudiéndose resumir la naturaleza de este fenómeno universal en las tres conclusiones que a continuación se adelantan y que resultan ser de gran trascendencia para el presente trabajo:

- 1ª) Cualquier tipo de radiación ionizante, ya sea corpuscular o electromagnética, desde el punto de vista de su interacción con la materia, queda siempre reducida a una mera interacción de partículas cargadas con el sistema material.
- 2ª) El sistema material, por su parte, presenta una total inespecificidad a nivel molecular frente a la radiación ionizante.

- 3ª) Como consecuencia de lo anterior, los sistemas biológicos no van a ser sino un caso más, indistinguible de cualquier otro sistema material, en lo que se refiere a la naturaleza de estos fenómenos iniciales.

Tanto en relación con el tema general de la interacción radiación-materia, como sobre las consecuencias más específicas, que se irán deduciendo respecto a su incidencia e implicación biológica, existe abundante información bibliografica (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8).

1.2.1. Radiación corpuscular

1.2.1.1. Con carga eléctrica

Las radiaciones naturales α y β , así como los protones, deuterones, etc., poseen intrínsecamente naturaleza corpuscular cargada, por lo que resulta inmediato que su tratamiento sea como tales partículas cargadas y, desde la perspectiva que aquí interesa, no precisen de mayor comentario.

1.2.1.2. Sin carga eléctrica (neutrones)

Dentro de la radiación corpuscular, el caso de los neutrones puede parecer en principio distinto, debido a su naturaleza no cargada. Esta característica excepcional que presentan hace que su interacción primaria con la materia tenga lugar exclusivamente a nivel de núcleos atómicos, a través de dos tipos de procesos: dispersión o absorción. En el primero de estos casos, que es el más frecuente cuando el material receptor está constituido por núcleos ligeros, se producen colisiones elásticas entre estos núcleos y los neutrones incidentes de moderada energía. Frente al mecanismo

anterior, el segundo proceso, es decir, la absorción de neutrones por parte de los núcleos, es mucho menos frecuente. La captura de neutrones da lugar entonces a núcleos atómicos altamente excitados, de vida media corta, que en el caso de que se trate de elementos ligeros pueden alcanzar un estado estable mediante la emisión de un fotón γ , y en el caso de núcleos intermedios o pesados, mediante la emisión de protones o partículas α .

Debido a que el H es el elemento mayoritario del material biológico, y considerando su favorable relación de masas con el neutrón, no resulta extraño que un 85-95% de la energía de los neutrones se transfiera al material biológico mediante colisiones elásticas con los núcleos de H, los cuales, a su vez, se transforman así en protones de retroceso.

Puede apreciarse, por consiguiente, que también en el caso de los neutrones el proceso queda reducido a la acción de partículas cargadas (véase 1.2.2.2. en relación con los casos de emisión γ), debiéndose en realidad a esta acción, más que a las propias colisiones y capturas iniciales de los neutrones, la mayor parte de los efectos biológicos de este tipo de radiación.

1.2.2. Radiación electromagnética

1.2.2.1. Interacción de las diferentes zonas del espectro elec- tromagnético con la materia

Con objeto de comprender mejor los procesos que tienen lugar cuando la radiación electromagnética interacciona con la materia, conviene tener presente que las variaciones que se observan a lo largo del es-

pectro electromagnético en toda su extensión no obedecen, en realidad, a cambios en la naturaleza de la energía electromagnética. Desde un punto de vista cualitativo se trata, por tanto, de algo gradual, sin discontinuidades. La única variación que existe corresponde a la longitud de onda, afectando, por consiguiente, a la energía electromagnética desde un punto de vista cuantitativo.

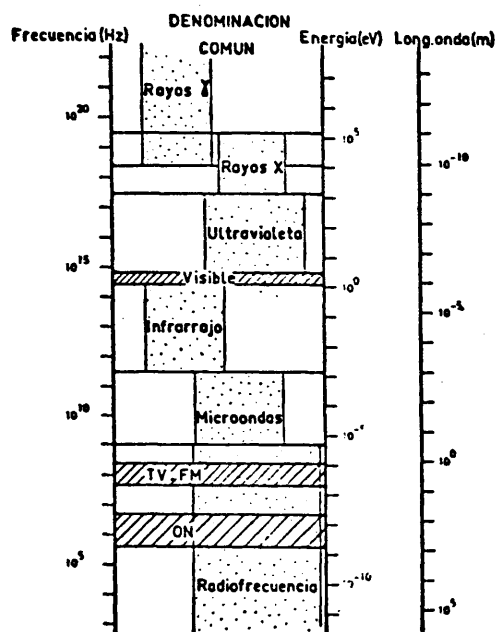


Figura 1.- Espectro electromagnético

Por este motivo, y como se verá a continuación, la división que habitualmente se suele hacer del espectro electromagnético resulta ser puramente convencional y de escasa relación con el tema que aquí se trata.

Si se comienza el análisis del espectro por el extremo de energías más bajas (fig.1), la primera observación importante que cabe hacer es que la temperatura ambiente supone una energía media de $1/40$ eV, valor que se sitúa en el infrarrojo. Por consiguiente, toda absorción de un fotón con energía inferior a la mencionada, es decir, de longitud de onda

superior a las del infrarrojo no supone ni el aporte energético necesario para alcanzar la temperatura ambiente, por lo que toda la región del espectro correspondiente a microondas y radioondas no tendrá la más mínima trascendencia en cuanto a los procesos de interacción que se estudian aquí. La zona superior del infrarrojo, con energías del orden de décimas de eV, implica energías de rotación y vibración, por lo que la interacción de esa parte del espectro con un sistema material supondrá sólo variaciones en la temperatura de éste.

Avanzando en el espectro en la misma dirección se encuentra a continuación una zona sorprendentemente estrecha, correspondiente al visible, y otra más extensa, el ultravioleta, en donde las energías implicadas se encuentran relacionadas con la formación de enlaces covalentes, al ser posibles las transiciones electrónicas en el material receptor de la radiación. Incluso en ocasiones puede estar presente ya la ionización.

Por último a longitudes de onda más bajas, es decir, en la zona de rayos X y rayos γ , cualquier fotón implica ya tanta energía que siempre estarán presentes los fenómenos de ionización.

De este modo, la división que se puede hacer del espectro electromagnético, si se toma como criterio su interacción con la materia, es muy simple, quedando reducido en realidad a tres zonas:

- Una primera región de bajas energías (microondas, radioondas, IR), de nula trascendencia para el material receptor, a excepción tan sólo de la parte más energética del IR, la cual puede dar lugar a incrementos de energía calorífica.

- Una segunda zona (visible y U.V.), en donde pueden producirse absorciones específicas de fotones en función de las transiciones electrónicas posibles. Como consecuencia de ello se pueden observar cambios químicos en el material receptor.
- Una tercera zona de altas energías (rayos X y γ), que siempre produce ionizaciones en un sistema material. De esta región del espectro, que es la que interesa en el presente trabajo, se pasa a hablar a continuación con más detalle.

1.2.2.2. Radiación electromagnética ionizante

En esta última zona del espectro, la elevada energía de los fotones no implica, según se ha dicho, cambios cualitativos en la naturaleza de la radiación. Por esta razón, no interesará ya demasiado distinguir entre la radiación X y la γ ; ambas son similares, y el detalle de su procedencia, que es lo único que en realidad las diferencia, no va a tener importancia aquí.

Una propiedad de estas radiaciones es que su intensidad, $I(x)$, decrece exponencialmente con el rango de penetración, x , según la expresión:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-\mu x} \quad (1.1)$$

en donde I_0 es la intensidad de la radiación incidente y μ el coeficiente de atenuación del material irradiado. Esta disminución de intensidad puede

óbedecer a dos causas: dispersión de los fotones, proceso en el que no existe transferencia de energía, sino un simple cambio de dirección en la onda incidente, o bien, transferencia de energía al material. Es decir, que el coeficiente de atenuación, μ , será en general la suma de un coeficiente de dispersión, σ , y de un coeficiente de absorción τ :

$$\mu = \sigma + \tau \quad (1.2)$$

Es evidente que en este estudio sólo la radiación absorbida es la que puede interesar, por lo que, en adelante se excluirá de la discusión todo lo referente a la radiación dispersada o transmitida.

El proceso inicial de absorción de los rayos X o γ se produce fundamentalmente por interacciones con los electrones atómicos del material receptor, según tres mecanismos básicos: efecto fotoeléctrico, efecto Compton y producción de pares.

Efecto fotoeléctrico

En este proceso toda la energía del fotón incidente se transmite a un electrón atómico. El electrón sale despedido entonces con una energía cinética, E_k , igual a la diferencia entre la energía del fotón, $h\nu$, y la de ionización, I .

$$E_k = h\nu - I \quad (1.3)$$

Efecto Compton

En este caso sólo una parte de la energía del fotón inciden-

te se transfiere al electrón expulsado. El fotón reduce por tanto su energía, es decir, se incrementa su longitud de onda, y cambia además su dirección, dependiendo el ángulo de la energía transferida.

Producción de pares

Este proceso de interacción, menos intuitivo, se hace posible cuando un fotón de energía superior a 1 MeV se aproxima al núcleo. En el campo nuclear tiene lugar entonces la aparición de un par electrón-positrón, con energía cinética distribuida entre ambos.

La probabilidad de que se produzca uno u otro de los tipos anteriores de absorción depende fundamentalmente del número atómico, Z , del átomo absorbente, según:

$$\text{Efecto fotoeléctrico} \sim Z^4$$

$$\text{Efecto Compton} \sim Z$$

$$\text{Producción de pares} \sim Z^2$$

De lo anterior se desprende (existe también dependencia, aunque menor, de la energía del fotón) que en los materiales pesados la absorción se llevará a cabo principalmente por efecto fotoeléctrico. Por el contrario, se puede adelantar ya que en los sistemas biológicos, debido al bajo número atómico de la casi totalidad de sus átomos componentes, exceptuados quizá S y P, la absorción se llevará a cabo, en general, mediante efecto Compton.

Una vez vistas las tres formas en que tiene lugar la transferencia inicial de energía por parte de los fotones incidentes, no resulta extraño que el principal efecto de estas radiaciones ionizantes sobre la materia venga dado, no tanto por la acción inicial de los propios fotones como por la acción posterior de los electrones rápidos que ellas generan (6). En efecto, estos electrones, a su vez, pierden progresivamente su energía cinética por interacciones coulombianas con otros electrones presentes en orbitales atómicos o moleculares que encuentran en su recorrido. La transferencia de energía por colisiones varía entre cero y valores muy altos, pero en la mayor parte de los casos es suficiente para producir nuevas ionizaciones.

En definitiva, como consecuencia del proceso inicial de transferencia de energía, queda un enjambre de ionizaciones y excitaciones en el trayecto de la partícula rápida.

1.2.3. Ecuación de Bethe-Bloch

Una vez que se ha visto que la radiación ionizante queda reducida a la acción de partículas cargadas interesa estudiar brevemente el modo de acción de estas partículas.

Si una partícula cargada pasa próxima a una molécula, la envoltura electrónica de ésta se ve perturbada. La probabilidad, $d\phi$, de que tenga lugar una transferencia de energía de valor comprendido entre W y $W + dW$, entre la partícula cargada y un átomo de los que encuentra a su paso viene dada por la expresión (9):

$$d\phi = \frac{2\pi e^2 (ze)^2}{mv^2} \cdot \frac{dW}{W^2} \quad (1.4)$$

en donde e es la carga del electrón, (ze) la carga de la partícula, m la masa en reposo del electrón y v la velocidad de la partícula.

El número de estas transferencias que tienen lugar por unidad de volumen, $d\nu$, en un material dado será entonces:

$$d\nu = N \cdot Z \cdot d\phi = \frac{2\pi e^4 z^2}{mv^2} \cdot N \cdot Z \cdot \frac{dW}{W^2} \quad (1.5)$$

siendo Z , en este caso, el número atómico efectivo del material y N el número de átomos por unidad de volumen.

A partir de estas consideraciones se llega a la ecuación de Bethe-Bloch (10), la cual define el concepto de "transferencia lineal de energía", $\frac{dE}{dx}$, es decir, la pérdida de energía que sufre la partícula cargada por unidad de recorrido, expresada precisamente en función de los parámetros anteriores:

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^2 (ze)^2}{mv^2} \cdot N \cdot Z \cdot \left[\ln \frac{2mv^2}{I} - \ln \left(1 - \frac{v^2}{c^2} \right) - \frac{v^2}{c^2} \right] \quad (1.6)$$

en donde además de las magnitudes ya vistas aparece el término I , que es el potencial medio de ionización y c , la velocidad de la luz (lo incluido entre corchetes son términos relativísticos, estrictamente válidos para partículas pesadas; para el caso de electrones la expresión es más compleja).

Observando esta ecuación de Bethe-Bloch se pueden deducir

varias consecuencias importantes.

En primer lugar, que la transferencia de energía es directamente proporcional a $(ze)^2$ e inversamente proporcional a v^2 , lo cual indica que, aunque la magnitud de la interacción depende, como era de esperar, de la carga de la partícula, las partículas lentas son mucho más efectivas que las rápidas en relación con este proceso. La capacidad de transferencia de energía de una partícula resulta estar, por tanto, paradójicamente, en relación inversa a su velocidad.

Pero la consecuencia realmente importante y que interesa destacar en relación con el presente trabajo es la que se deriva de la presencia en la ecuación anterior, del término NZ , correspondiente a la "densidad electrónica". Puede observarse que NZ no hace referencia alguna a la estructura molecular. En otras palabras, a la partícula cargada le resulta indiferente la forma química en que se encuentren presentes los átomos y moléculas del material irradiado; la partícula, en su recorrido, sólo "ve" nubes de electrones, presentando así la materia una total inespecificidad a nivel molecular frente a la radiación ionizante.

Puede verse, por tanto, al llegar aquí que han quedado confirmadas las tres conclusiones que se adelantaron en 1.2.

Cabe sin embargo hacer algunas precisiones en relación con los sistemas biológicos. Estos no sólo van a ser un caso más, indistinguible de cualquier otro sistema material, sino que, como se ha visto, el valor tan parecido de número atómico que presentan sus elementos cons-

tituyentes hace que la inespecificidad, además de manifestarse a nivel molecular, se manifieste a nivel atómico. El material biológico es, de este modo, un material prácticamente "homogéneo" frente a la radiación ionizante (11), en el que la transferencia de energía tiene lugar de una forma completamente aleatoria, casi exclusivamente mediante efecto Compton.

Ahora bien, si se hacen algunas consideraciones de tipo cuantitativo en relación con las dosis de radiación ionizante que conducen a efectos letales en los seres vivos, se deduce que el material biológico presenta una marcada sensibilidad a la radiación, hecho que parece estar en contradicción con las conclusiones que se acaban de mencionar. Así por ejemplo (7), en el caso de E. Coli, haciendo cálculos a partir de los 4 Krad correspondientes a la dosis $D_{37\%}$, que es la necesaria para provocar la muerte del 63% de la población bacteriana, se llega a la conclusión de que el aporte energético letal medio por célula es muy pequño: del orden de $2 \cdot 10^{-14}$ cal/célula, lo que equivaldría, si esa energía se distribuyera de una manera uniforme por toda la célula, a un incremento de temperatura de tan sólo 10^{-2} °C. En células de mamífero esta sensibilidad es aún mayor, pues los mismos cálculos conducen a valores de milésimas de grado. En consecuencia, si se considera de una forma global, el aporte energético de una dosis letal es absolutamente despreciable en comparación con la importancia del efecto biológico que supone, y por tanto, la explicación del hecho paradójico de que a dosis tan bajas la célula muera no se puede hacer teniendo en cuenta solamente aspectos energéticos cuantitativos.

Queda entonces la pregunta de qué es lo que realmente sucede

en los seres vivos para que éstos presenten la singular característica de poseer una sensibilidad tan acusada a la radiación.

1.3. INTERACCION RADIACION IONIZANTE-DNA

La única respuesta a la pregunta anterior que pueda ser compatible con todo lo expuesto hasta aquí será la que en Radiobiología formula la conocida teoría del "blanco" o "diana" (12). Según esta teoría, en el material biológico existen determinados "elementos de volumen" en los que la acción de la radiación tiene como consecuencia la producción de una alteración irreversible en algún componente de trascendencia vital para el ser vivo.

Teniendo en cuenta la enorme variedad de especies moleculares existentes en la célula, se comprende que muchas ionizaciones no conducirán a una lesión observable si las estructuras o moléculas alteradas pueden ser rápidamente eliminadas y posteriormente sustituidas. Solamente aquellos componentes celulares que no puedan ser reemplazados y al mismo tiempo sean imprescindibles para un correcto funcionamiento de la actividad celular constituirán un "blanco" en los procesos de transferencia de energía de las partículas cargadas.

Las lesiones en las moléculas revestirán por tanto mayor gravedad cuanto menor sea el número total de moléculas de esa especie existentes en la célula y cuanto mayor sea su importancia funcional.

Ambos factores concurren de una forma singular en la molécula del DNA, por lo que sobre esta molécula se ha de situar ya la sospecha de que sea el principal blanco de la radiación (7).

En efecto, en la molécula del DNA se encuentra almacenada toda la información necesaria para materializar nada menos que la propia cé

lula y su funcionalidad. Ello hace pensar que cualquier alteración o deterioro de otros componentes celulares se verá subsanado con cierta facilidad, en virtud precisamente de esa capacidad potencial contenida en el DNA. Por el contrario, la menor lesión que impida al propio DNA proseguir su actividad, lo incapacite para la duplicación o incluso afecte a la actividad del nuevo DNA procedente de la duplicación, será, por las mismas razones, de consecuencias negativas para la pervivencia de la célula o de su descendencia.

Queda, pues, explicada la elevada radiosensibilidad que presentan los seres vivos. Ciertamente, el material biológico se comporta como algo homogéneo e inespecífico frente a la acción primaria de la radiación ionizante. Sin embargo, dentro de su propio nivel biológico, la enorme heterogeneidad y diferencia numérica relativa de las especies moleculares, así como su jerarquización funcional, explican la diferencia de comportamiento de una célula respecto a un sistema químicamente homogéneo. En un cristal inorgánico u orgánico, por ejemplo, se necesitan dosis de radiación mucho más altas para detectar perturbaciones.

En definitiva, la probabilidad de que se produzca una alteración en la molécula de DNA es, en sí, baja, pero sus consecuencias son de gran trascendencia para el ser vivo.

Hay, sin embargo, un punto muy importante a considerar aquí (11). El 75% de la materia viva es agua. Por otra parte las disoluciones acuosas de DNA con las que generalmente se trabaja, debido sobre todo a su elevada viscosidad, prácticamente nunca sobrepasan una concentración en DNA de 1 mg/ml, lo que supone una relación en peso DNA/H₂O

muy baja (0,001). Es decir, incluso en los casos de mayor concentración, las disoluciones de DNA son en realidad muy diluídas.

La consecuencia de ésto es entonces inmediata: tanto "in vivo" como "in vitro" (excluyendo de este último caso la irradiación de DNA sólido), y considerando además la "homogeneidad" atómica que se observa en ambos casos a efectos de la radiación, es mucho más probable que la transferencia primaria de energía se realice sobre las moléculas de H_2O . Es decir, el efecto que pueda producir la radiación ionizante sobre la molécula de DNA será casi exclusivamente consecuencia de una acción indirecta, llevada a cabo a partir de las especies reactantes formadas en el H_2O . Esto no quiere decir, como es lógico, que no exista la posibilidad de que se produzca una interacción directa fotón-DNA. Simplemente lo que significa es que esta interacción resulta muy poco probable en comparación con la interacción fotón- H_2O .

Se debe considerar también que "in vivo" existe otra posibilidad de llevarse a cabo la acción indirecta de la radiación (6). Las moléculas orgánicas próximas al DNA pueden recibir la lesión primaria, a su vez directa o indirectamente, convirtiéndose en radicales. Reacciones posteriores de estos radicales pueden contribuir a los ataques que reciba la molécula del DNA. En realidad, procesos de este tipo parecen estar implicados en la actuación de determinados modificadores de la radiosensibilidad, concretamente los radiosensibilizantes oxígeno-miméticos.

Conviene, sin embargo, dejar claro aquí un punto. La teoría del blanco explica satisfactoriamente las curvas de supervivencia expo-

nenciales que continuamente aparecen en Radiobiología sin hacer men-
ción alguna a la naturaleza de los procesos primarios de transferencia
de energía, ataques indirectos por radicales o al tipo de alteración pro-
ducida en la molécula del DNA. Es más, no especifica siquiera que la
molécula de DNA sea el blanco crítico de la radiación ionizante. A tra-
vés de los parámetros de la ecuación de Poisson sólo habla de "impac-
tos" en "elementos de volúmen" (13).

Sin embargo, no existe incompatibilidad alguna en abordar
el estudio del problema considerando conjuntamente ambas perspectivas.
El hecho de que esta teoría hable de una "acción localizada" en "volúme-
nes de blanco" muestra su validez, ya que estos volúmenes pueden in-
cluir perfectamente al DNA y un cierto entorno acuoso.

Por último, hay que mencionar brevemente un hecho muy impor-
tante. Hoy en día está comprobado que muchos tipos de lesión en la mis-
ma molécula de DNA son reparados por la propia célula mediante la in-
tervención de determinadas enzimas (14), en un proceso complejo que ac-
tualmente es objeto de estudio.

Los seres vivos demuestran poseer así una asombrosa capaci-
dad de defensa y recuperación, al menos hasta un cierto grado, frente a
la radiación.

Estos mecanismos de reparación, que explican la formación
de los "hombros" característicos que presentan las curvas de superviven-
cia para dosis bajas de radiación, tampoco contradicen la teoría del blan-
co. El concepto de acción localizada sigue siendo válido, si bien, como
consecuencia de este hecho, en el tratamiento matemático se ha de aban-

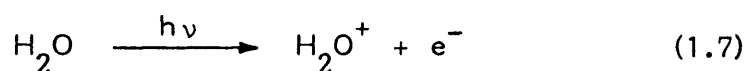
donar el primitivo supuesto de que sea 1 el valor de la eficiencia letal de cada impacto en el blanco (13).

Esta mención final a los procesos de reparación celular ha de servir al mismo tiempo para prevenir del peligro que supone olvidar la enorme distancia que ha de existir entre los procesos que realmente tienen lugar "in vivo" y las extrapolaciones que a aquella situación se pueden efectuar desde la experimentación "in vitro".

1.3.1. Radicales inducidos en el H₂O

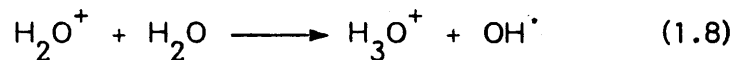
Debido a la importancia que, según se ha puesto de manifiesto, tienen los ataques indirectos a la molécula de DNA, se hará ahora un breve resumen de las especies que se originan en el agua por la acción de la radiación.

El proceso inicial de la ionización de una molécula de H₂O da lugar a la aparición de un ión radical, H₂O⁺, (15) y un electrón, e⁻:



A partir de aquí, tanto el H₂O⁺ como el e⁻, pueden seguir distintas vías de reacción, en ocasiones interdependientes, como se indica a continuación.

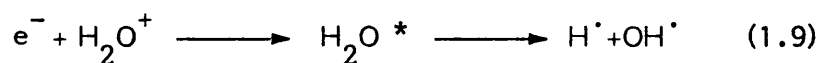
El radical ión H₂O⁺ posee una vida extremadamente corta (16), reaccionando rápidamente (10⁻¹⁴ sg) con una molécula de H₂O según:



proceso en el que, junto a un hidrogeni3n, aparece ya el radical OH^\cdot , radical oxidante, estable y muy activo.

Por su parte, el electr3n e^- originado en la ionizaci3n primera, mientras conserva suficiente energ3a cin3tica, es capaz de producir nuevas ionizaciones en otras mol3culas de H_2O , repiti3ndose de este modo el proceso de la ecuaci3n (1.7). No obstante, cuando su energ3a cin3tica ha disminuido suficientemente puede suceder, o bien que se recombine con el i3n radical H_2O^+ , o bien que se produzca su "solvataci3n".

La recombinaci3n con el i3n radical H_2O^+ da lugar a mol3culas de agua en estado excitado, H_2O^* , las cuales, por este motivo, pueden disociarse, originando el radical reductor H^\cdot y el radical oxidante OH^\cdot , que de este modo aparece de nuevo:

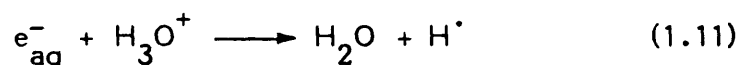


La segunda de las posibilidades, la solvataci3n o hidrataci3n del electr3n, se produce por deslocalizaci3n del electr3n "terminalizado" entre un cierto n3mero de mol3culas de H_2O (17):



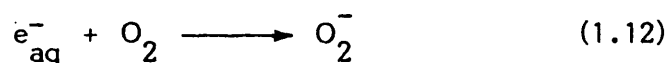
Aqu3 tambi3n se dan dos posibilidades de reacci3n para estos electrones solvatados.

La primera posibilidad es que el e_{aq}^- reaccione con los H_3O^+ , los cuales pueden estar presentes antes de la irradiación, en el caso de que se trate de soluciones ácidas, o bien en todo caso, como consecuencia de la radiación, según se ha visto en la ecuación (1.8):

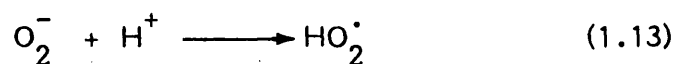


(tanto esta ecuación (1.11) como la ecuación (1.9) tienen interés por dar lugar a la aparición del radical reductor H^\cdot , que es la única especie reductora capaz de reaccionar con los solutos, a consecuencia de su vida media mayor). No obstante, la reacción (1.11) queda inhibida en medios alcalinos por competir con ella la reacción de neutralización, de constante de velocidad más alta.

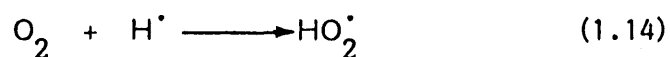
La otra posibilidad de reacción del electrón solvatado es con el O_2 disuelto en el medio:



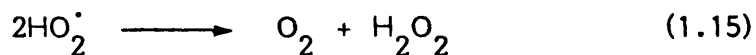
Posteriormente el O_2^- así formado reacciona con el H^+ dando el radical hidropéroxido, HO_2^\cdot :



radical al que también se puede llegar por otro camino, reaccionando el O_2 con la otra especie reductora, es decir, con el radical H^\cdot :



Por último, el radical HO_2^\cdot puede, a su vez, recombinarse consigo mismo, dando lugar a O_2 y H_2O_2 :



Hay que decir aquí que tanto la reacción del e_{aq}^- con el O_2 (ecuación 1.12) como con el H_3O^+ (ecuación 1.11) son reacciones sin energía de activación, por lo que sólo se verán controladas por la velocidad de difusión de las especies radicales. Por consiguiente, el camino a seguir por los e_{aq}^- dependerá fundamentalmente de las concentraciones que existan de O_2 y H_3O^+ .

Todo este proceso de radiólisis del H_2O , que, como se ve, es complejo, y sobre todo interdependiente, se puede apreciar mejor en la fig. 2, tomada de la revisión efectuada por Mingot (18) sobre este tema.

No obstante, y en relación con las especies radicales que pueden interesar aquí por su capacidad de reacción frente a la molécula de DNA, se puede resumir esquemáticamente el proceso en la siguiente tabla I:

T A B L A I

Especies radicales primarias

	<u>Ausencia de O_2</u>	<u>Presencia de O_2</u>
Medio ácido	$\text{H}^\cdot \text{OH}^\cdot$	$\text{HO}_2^\cdot \text{OH}^\cdot$
Medio neutro	$\text{e}_{\text{aq}}^- \text{H}^\cdot \text{OH}^\cdot$	$\text{O}_2^- \text{OH}^\cdot$
Medio alcalino	$\text{e}_{\text{aq}}^- \text{OH}^\cdot$	$\text{O}_2^- \text{OH}^\cdot$

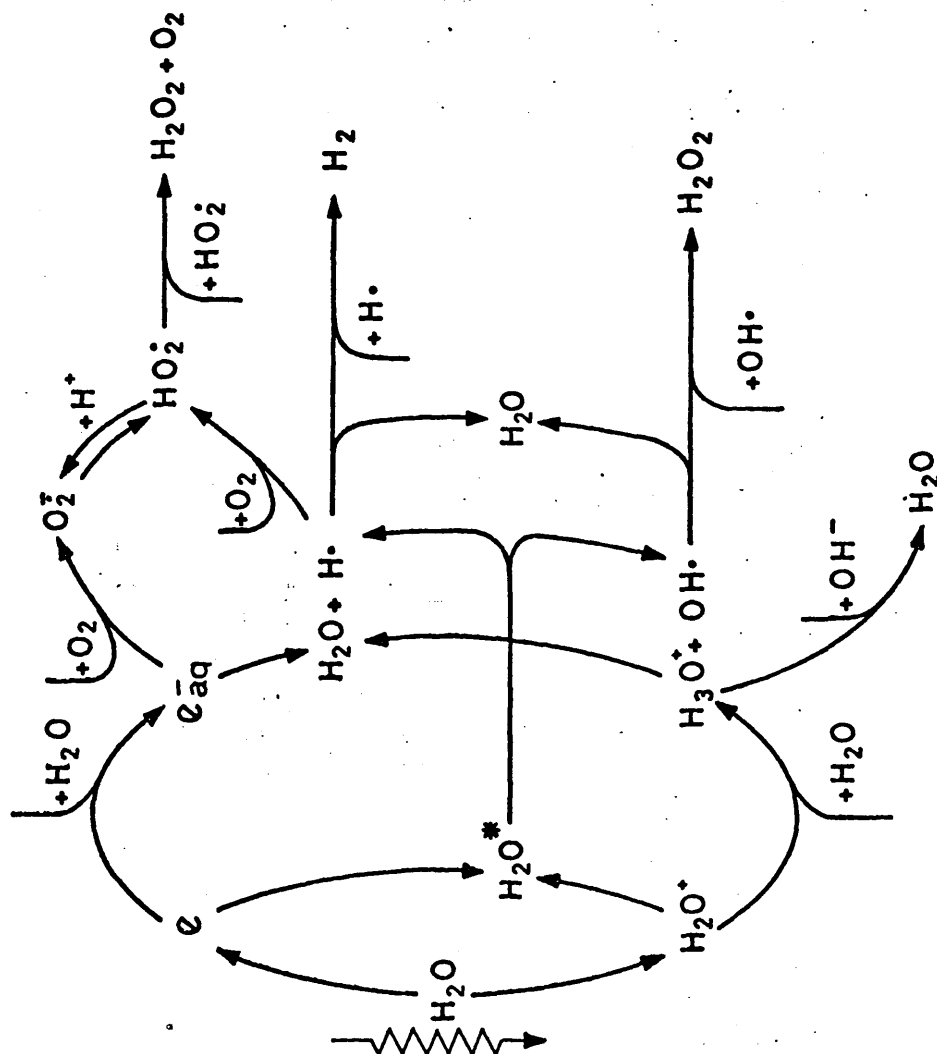


Figura 2.- Especies inducidas en el H_2O por efecto de la radiación ionizante (Mingot, 1.972).

Es decir, salvo en aquellos casos en que la disolución haya sido desgasificada antes de producirse la irradiación, las especies reductoras H^\bullet y e_{aq}^- desaparecerán por reacción con el O_2 disuelto, proporcionando, según sea el pH del medio, los radicales O_2^- y H_2O^\bullet . Ahora bien, en estas condiciones de no desgasificación previa, que son las que interesan en el presente trabajo, la especie oxidante OH^\bullet siempre estará presente, siendo por otra parte la única especie radical verdaderamente activa, ya que el radical H_2O^\bullet , debido a su baja reactividad frente a los solutos orgánicos, no puede competir con aquélla (19).

Esta simplificación del fenómeno es de suma importancia porque, como se verá a continuación, el estudio de la acción indirecta de las especies radioinducidas en el agua sobre la molécula del DNA quedará reducido, en la práctica, al estudio de la reactividad que presente el radical OH^\bullet frente a los componentes de aquella macromolécula (8) (18).

1.3.2. Acción de los radicales sobre la molécula de DNA

El problema que se ha de abordar ahora es, pues, el de intentar interpretar las alteraciones o "lesiones" que aparecen en el DNA irradiado, detectables a nivel experimental, desde esta perspectiva mecánica de una acción indirecta. Las alteraciones de que se habla son las siguientes (20):

- Alteraciones en las bases nitrogenadas
- Rupturas simples de cadena
- Rupturas dobles de cadena
- Enlaces cruzados entre cadenas

Ya en principio hay que decir que el problema es complejo y dista aún mucho de estar esclarecido, por lo que solamente se hará una breve referencia sobre algunos mecanismos que parecen intervenir en los procesos, remitiendo cualquier ampliación sobre este tema a la reciente revisión efectuada por Ward (8).

La deducción que se ha hecho en el estudio de la radiolisis del agua sobre el papel exclusivo del radical OH^\bullet en el ataque al DNA se ha visto confirmada mediante estudios experimentales. Por una parte, las lesiones producidas en el DNA disminuyen notablemente en presencia de sustancias captadoras de dichos radicales. Por otra parte, estudios más complejos sobre las especies intermedias formadas por ataques de otros radicales parecen revelar para éstos mucha menor cuantía y trascendencia biológica (8).

Queda de este modo plenamente justificado que se centre el estudio sobre la acción del radical OH^\bullet , para lo cual se harán en primer lugar algunas consideraciones sobre su reactividad.

En general, el radical OH^\bullet tiende a pasar a ión oxhidrilo, OH^- , que es su forma estable reducida. Esta reacción red-ox, con un potencial oxidante muy elevado, que habla de su alta reactividad, puede llevarse a cabo según tres mecanismos distintos, dependientes de la naturaleza de las moléculas con las que interacciona: 1) Reducción por transferencia electrónica. 2) Reducción por transferencia de átomos de H. 3) Reducción por adición a insaturaciones. El primero de estos mecanismos es el que normalmente se produce con los iones inorgánicos, y el único interés que puede tener aquí se refiere a que es el fundamento de los sis

temas de dosimetría que se han utilizado en la parte experimental de este trabajo. El segundo de los mecanismos, típico en la interacción con moléculas orgánicas saturadas, no va a interesar aquí. Sin embargo, el tercero, presente como es lógico frente a moléculas que posean insaturaciones olefínicas, hace pensar ya en las bases nitrogenadas del DNA.

1.3.2.1. Alteraciones en las bases

Uno de los puntos que parecen comprobados en relación con las alteraciones producidas en las bases nitrogenadas es precisamente la inicial adición de los radicales OH^\bullet a un doble enlace, dando lugar a un radical hidroxiderivado. Este radical puede evolucionar posteriormente de distintas maneras, dependiendo de las condiciones del medio (21).

En la fig. 3 se presenta un esquema de las consecuencias derivadas de la adición del electrón solvatado y del radical OH^\bullet al doble enlace 5,6 de una pirimidina. En relación con el radical OH^\bullet , se puede observar que, además de una posible recombinación entre los radicales hidroxiderivados inicialmente formados, regenerando el doble enlace, existen dos posibilidades distintas de evolución. Si la concentración de OH^\bullet es elevada, el radical hidroxiderivado de las pirimidinas adiciona un segundo radical OH^\bullet , dando lugar a un glicol, el cual puede a su vez perder una molécula de agua, produciendo isobarbitúricos. Si en la solución existe O_2 disuelto, el radical inicial evoluciona, formando hidroxihidroxidroxiderivado. Hay que decir, sin embargo, que incluso en estas últimas condiciones los hidroxihidroxidroxiderivados, pese a ser pro

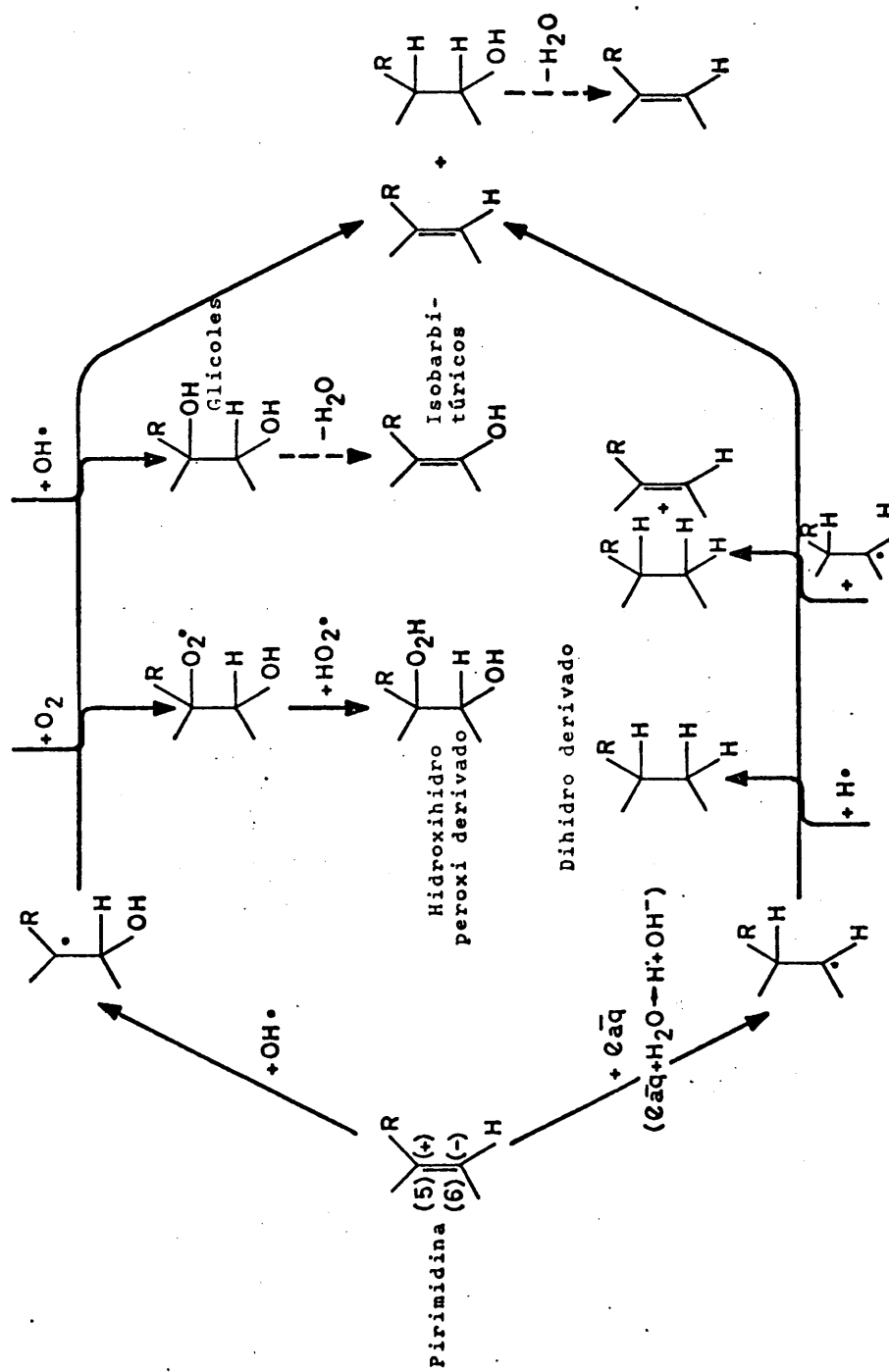


Figura 3.- Adición del radical $\text{OH}\cdot$ y del electrón solvatado al doble enlace 5,6 de una pirimidina (Mingot, 1.972).

ductos mayoritarios, no son nunca exclusivos, como se desprende de los rendimientos radiolíticos de destrucción de pirimidinas y de producción de aquellos derivados. Sobre la formación de otros derivados, y los mecanismos posibles que les puedan dar lugar por ataque del radical OH^\bullet no existen todavía criterios seguros (8).

Respecto a la radiolisis de las purinas la situación es aún más oscura. Se sabe, no obstante, que el radical OH^\bullet , en presencia de O_2 se adiciona al doble enlace 4,5, dando origen a un radical hidroxihidroperoxidoderivado (22) (23).

Otro punto que, aunque interesante, no parece del todo esclarecido es el de las posibles diferencias de reactividad frente al radical OH^\bullet , entre las bases púricas y pirimidínicas. De confirmarse los datos que existen en este sentido (24) (11), podría en principio pensarse en la existencia de puntos de ataque preferenciales a lo largo de la molécula de DNA. Sin embargo, la enorme cantidad de bases presentes en esta biomolécula, junto con el hecho de que, en buena aproximación, se pueden considerar distribuídas al azar sobre la misma, permite minimizar las consecuencias de aquella posibilidad. En definitiva, se puede admitir que el ataque radical tiene lugar en un punto cualquiera de la macromolécula.

1.3.2.2. Rupturas simples de cadena

Es evidente que una ruptura simple de cadena aparecerá siempre que se produzca una discontinuidad en la serie sucesiva azúcar-fosfato que forma el armazón de la cadena polinucleotídica.

En el caso concreto de que la timina forme parte de un nucleósido o nucleótido, parece demostrado que el hidroxihidroperoxi-derivado que se forma después de la adición del radical OH^\bullet al doble enlace 5,6 de la base no conduce a la aparición de una ruptura internucleotídica. En este caso no se produce siquiera la hidrólisis del enlace N-glucosídico establecido entre el nitrógeno 1 de la timina y el carbono 1' de la desoxirribosa, sino que el hidroxihidroperoxiderivado permanece unido a la cadena (25). Este dato experimental reviste una especial importancia en relación con la interpretación de los mecanismos que puedan dar lugar a la aparición de las rupturas simples de cadena, porque pone de manifiesto que la alteración de una base no implica necesariamente la aparición de una ruptura.

De este modo, se hace necesario centrar el estudio en las consecuencias que pueda tener el ataque radical sobre la molécula de azúcar.

La desoxirribosa puede ser atacada tanto por el radical reductor H^\bullet , para el que presenta sin embargo muy baja reactividad (26), como por el radical oxidante OH^\bullet . En el caso de nucleótidos, esta última reacción queda puesta de manifiesto por la liberación de ortofosfato inorgánico, liberación que no tendría lugar si el ataque radical se efectuara sobre la base.

Ante el hecho sorprendente de no existir en la bibliografía más intentos de interpretación mecanística de la ruptura internucleotídica que una referencia de Scholes (27) a la inestabilidad de las β -ceto y β -aldehídoalcoholes frente a la hidrólisis (28), Mingot (9) propuso

el estudio de tres tipos distintos de ataque del radical OH^\cdot a la molécula de desoxirribosa, según el esquema de la fig. 4. En este esquema puede observarse que la hidrólisis del ester fosfórico del azúcar a que hace referencia Scholes se produce como consecuencia del ataque del radical al carbono 3'. Asimismo están representados los ataques del radical OH^\cdot a los carbonos 5' y 1'.

En la fig. 5 se muestran los diferentes tipos de ruptura a que dan lugar las tres posibilidades de ataque mencionadas, detallándose la naturaleza química de los terminales que se producen así como las especies que se liberan.

Los datos experimentales más fidedignos de rendimientos radio-líticos indican (29) que las rupturas radioinducidas en las cadenas polinucleotídicas van acompañadas en el 80% de los casos de aparición de grupos fosfato en posición 5'. Al mismo tiempo, en un 30% de estos casos aparecen bases libres y en otro 30% de casos se liberan nucleósidos alterados.

Confrontando estos resultados con las posibilidades de reacción antes mencionadas, se puede pensar que las tres rutas propuestas por Mingot explican el 80% de los casos de aparición de terminales fosfato en 5', con una eficacia aproximadamente equivalente para cada una de ellas. Queda, sin embargo, por explicar el restante 20% de los casos de formación de terminales fosfato en 5', en el que al parecer se liberan nucleósidos intactos.

Enfocando ahora el problema desde un punto de vista experimen

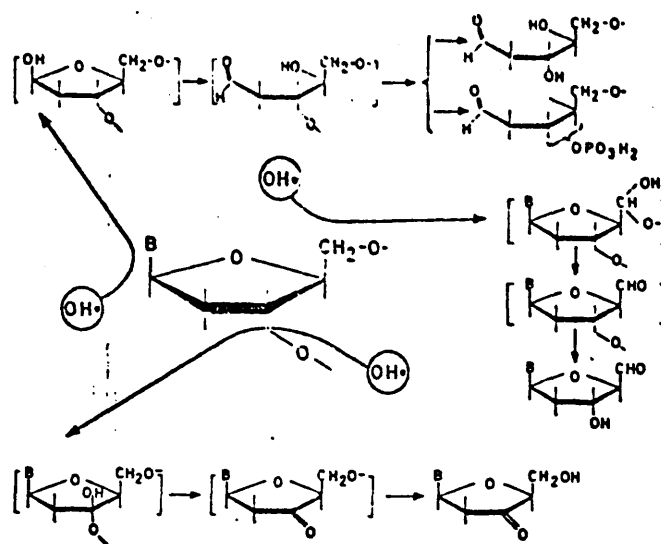


Figura 4.- Mecanismo de oxidación del carbono 3' de la desoxirribosa por el radical OH^\bullet (Mingot, 1.972).

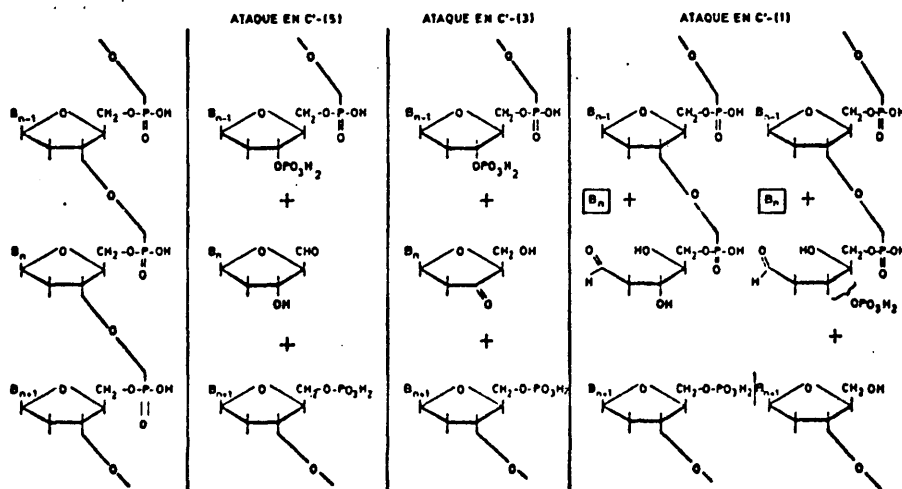


Figura 5.- Distintas posibilidades de ruptura internucleotídica (Delgado y otros, 1.974).

tal, las rupturas simples de cadena se pueden detectar por métodos de valoración de fosfatos liberados enzimáticamente. Sin embargo, una forma más directa de reflejarse la aparición de estas rupturas será mediante la comprobación de la disminución de la masa molecular del DNA desnaturalizado, es decir, DNA al que después de la irradiación se le hayan separado las cadenas complementarias que forman la doble hélice. El estudio de la masa molecular de este DNA y su comparación con la masa molecular del DNA desnaturalizado correspondiente a un control no irradiado, permite efectuar el cálculo de las rupturas simples producidas.

Ahora bien, dado que en la mayor parte de las muestras de DNA (exceptuadas las de virus aislados con especial cuidado) el material de partida no es homogéneo desde el punto de vista de la masa molecular, ésta no podrá expresarse más que como un promedio de las masas moleculares realmente existentes en un momento dado. En este sentido interesa destacar aquí dos tipos de promedios de masa molecular, entre los que se suelen definir en estos casos (30): la masa molecular promedio en peso

$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (1.16)$$

y la masa molecular promedio en número

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (1.17)$$

siendo n_i en ambas expresiones el número de moléculas cuya masa molecular es M_i .

Como es evidente, ambos promedios serán coincidentes en el caso de una sustancia monodispersa, y por tanto, la relación M_w/M_n proporciona una idea del grado de heterogeneidad de tamaños moleculares existente. En distribuciones al azar de masas moleculares, caso frecuente en muestras de DNA, se suele observar una relación $M_w/M_n = 2$ (31).

Conocidos los valores M_w y M_n del DNA irradiado y los M_{w_0} y M_{n_0} correspondientes a un control sin irradiar del mismo DNA, se pueden calcular las rupturas simples que se han producido a consecuencia de la radiación, aplicando la siguiente ecuación general de Charlesby (32) que, como se verá, también es válida para el cálculo de rupturas dobles:

$$B = \frac{2m}{3} \left(\frac{2}{M_n} - \frac{1}{M_w} - \frac{2}{M_{n_0}} + \frac{1}{M_{w_0}} \right) \quad (1.18)$$

en donde B es el número de rupturas referidas a un nucleótido y m la masa media de éste.

No obstante, es frecuente también efectuar este cálculo comparando solamente los promedios en número de la masa molecular (33) (34). En este caso el razonamiento es bien sencillo: si una masa molecular inicial M_{n_0} se reduce por efecto de la radiación a un valor M_n , el número de rupturas sufridas por molécula habrá sido $\frac{M_{n_0}}{M_n} - 1$. Por consiguiente, la frecuencia de rupturas referida a un nucleótido será:

$$B = \left(\frac{M_{n_0}}{M_n} - 1 \right) \frac{m}{M_{n_0}} = m \left(\frac{1}{M_n} - \frac{1}{M_{n_0}} \right) \quad (1.19)$$

En el DNA irradiado, tanto en estado sólido (35) (36) como en disolución (33) (37), el número de rupturas simples por nucleótido, B_1 ,

resulta ser directamente proporcional a la dosis D recibida:

$$B_1 = k.D \quad (1.20)$$

siendo k la probabilidad de ruptura por nucleótido y por unidad de dosis.

1.3.2.3. Rupturas dobles de cadena

En contraste con el insatisfactorio conocimiento que se posee acerca de la naturaleza de la ruptura simple de cadena, existe hoy un total acuerdo en admitir que, siempre que se trate de DNA irradiado en solución, la ruptura doble de cadena se produce como consecuencia de la coincidencia, más o menos estricta, de dos rupturas simples, situadas en lugares opuestos de cada una de las cadenas complementarias del DNA.

El hecho de suponer a la ruptura doble como una consecuencia estadística de la coincidencia de rupturas simples fue pronto intuído por los investigadores, al observar que el modelo teórico de Charlesby (38) (31), referente a la degradación de homopolímeros artificiales por cualquier agente productor de rupturas no era exactamente aplicable al caso del DNA irradiado en solución.

En efecto, y sin entrar en los detalles de su deducción, según la teoría de Charlesby, el grado de polimerización medio, u , después de una dosis D viene dado por la expresión:

$$u = \frac{1}{k (D_0 + D)} \quad (1.21)$$

en donde k es la probabilidad de ruptura de un enlace cualquiera por unidad de dosis y D_0 una "dosis" virtual que se supone daría lugar a la distribución de partida de las masas moleculares, como consecuencia de la ruptura de "una única molécula original".

Por otra parte, siendo la masa molecular promedio en número, M_n , proporcional al grado de polimerización según:

$$M_n = u \cdot m \quad (1.22)$$

donde m es la masa molecular del monómero, se llega a la expresión:

$$M_n = \frac{m}{k (D_0 + D)} \quad (1.23)$$

Sometiendo este modelo teórico a comprobación experimental, Cox y otros (39) (40) encontraron ciertas divergencias con los valores obtenidos a partir de medidas viscosimétricas. No obstante, fueron ellos mismos quienes ya supusieron que si el DNA era efectivamente una cadena doble, su ruptura, es decir, la ruptura doble, podría producirse por coincidencia de rupturas simples opuestas, siempre que hubiera un ataque químico local por radicales.

Este nuevo supuesto, en realidad, no rechaza los planteamientos de la teoría de Charlesby, sino que implica solamente una modificación en el punto correspondiente a la probabilidad del suceso de ruptura.

La probabilidad no será ahora proporcional a la dosis, sino a su cuadrado, con lo que la expresión (1.23) se transforma en:

$$Mn = \frac{m}{k (D_o + D)^2} \quad (1.24)$$

La buena concordancia, en este caso, entre la teoría y los datos experimentales vino a confirmar la veracidad de esta nueva hipótesis, al mismo tiempo que debido a las fechas en que se realizaron, estos trabajos tuvieron la importancia de aportar una prueba más en favor del modelo bicatenario de Watson y Crick.

Los trabajos posteriores de Peacocke y Preston (41), así como los de Hagen (42) (33), no han hecho sino confirmar y ampliar las conclusiones anteriores, haciendo referencias a la dependencia entre número de rupturas y dosis suministrada.

Se ha de destacar aquí el hecho de que, así como se ha visto que existe una inespecificidad local por parte de las cadenas polinucleotídicas en relación con la producción de rupturas sencillas, la naturaleza puramente estadística del proceso de coincidencia de éstas da lugar, con mayor razón, a que la ruptura doble se produzca al azar, sin ningún tipo de preferencia local sobre la molécula de DNA (9).

Hay que hacer sin embargo una pequeña precisión a todo lo dicho. La probabilidad de ruptura doble se ve ligeramente incrementada, debido a que en el entorno próximo a una ruptura simple, siempre se produce una desestabilización de enlaces de H entre las bases, hecho que

da lugar a que la coincidencia no tenga que ser del todo estricta. Sobre la valoración y extensión de esta desestabilización local, y consiguiendo, el número de pares de nucleótidos que pueden verse implicados en una ruptura doble puede consultarse un reciente trabajo realizado por Jorcano (34).

En relación ahora con el cálculo de las rupturas dobles, resulta evidente que si éstas dan lugar a una degradación del DNA nativo, es decir, a la formación de moléculas de menor masa molecular, aquí también será válido el método de estudio que se ha visto para el DNA des naturalizado respecto al cálculo de rupturas simples. Por tanto, aplicando las mismas ecuaciones (1.18) y (1.19) al estudio de los fragmentos de DNA nativo irradiado, y relacionándolos con controles no irradiados, el valor, B_2 , que se obtiene corresponde en este caso a la frecuencia de rupturas dobles referida a un nucleótido par.

Por otra parte, teniendo en cuenta todo lo que se ha dicho sobre la formación de la ruptura doble, se comprende fácilmente que la relación entre número de rupturas dobles y dosis suministrada venga dada finalmente (33) por la expresión:

$$B_2 = (\beta + B_1)^2 \cdot n = (\beta + kD)^2 \cdot n \quad (1.25)$$

en donde B_1 , como ya se vió, es el número de rupturas simples por nucleótido, β el número de rupturas simples presentes antes de la irradiación (frecuentemente despreciable a altas dosis) y n es el número total de pares de nucleótidos desestabilizados en el entorno de una ruptura simple.

La fig. 6, elaborada a partir de datos experimentales, confirma perfectamente esta dependencia de B_2 respecto del cuadrado de la dosis.

Lo anterior contrasta, pues, con los resultados que se obtienen de la irradiación del DNA sólido (35) (36). En este caso, las rupturas dobles se producen directamente como consecuencia del impacto de los fotones, por lo que la dependencia de B_2 con la dosis es lineal.

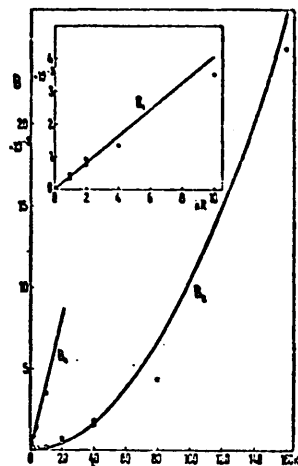


Fig. 6.- Rupturas simples (B_1) y dobles (B_2) a distintas dosis (Hagen, 1.967)

Por último hay que decir que el modelo matemático propuesto por Mingot (9), pretende explicar de una manera general la fenomenología de los procesos de degradación radiolítica del DNA en solución, ofreciendo así una visión sintética de los resultados obtenidos en este campo, al mismo tiempo que establece una correlación con otros procesos de degradación del DNA.

1.3.2.4. Enlaces cruzados

El último tipo de alteración del DNA irradiado que se considerará aquí, más complejo y no siempre presente, se refiere a la aparición de enlaces cruzados entre las distintas cadenas.

En el caso del DNA irradiado en seco está comprobado que se producen estos enlaces intermoleculares, y en su formación parecen in-

tervenir los radicales que aparecen sobre las cadenas (35) (36). En favor de esta hipótesis está precisamente la inhibición parcial que sobre este fenómeno produce la presencia de O_2 (35), hecho que se interpreta como una reacción competitiva del O_2 con los radicales para formar peroxirradicales.

Respecto al DNA irradiado en solución el problema es, sin embargo, más complejo. En el proceso de formación de enlaces cruzados influyen en este caso numerosos factores, como el tamaño, concentración y conformación de las macromoléculas, fuerza iónica del disolvente, efectos polares, etc.

No obstante, y a falta de datos respecto a la influencia de estos factores, pueden resultar interesantes ciertos estudios realizados con polímeros sintéticos en solución (43). En estos estudios parece demostrado que existe una concentración óptima y otra concentración crítica mínima en relación con la producción de enlaces cruzados entre cadenas. Por encima de la concentración óptima, la velocidad de formación de enlaces cruzados por unidad de dosis decrece progresivamente, hasta aproximarse al valor obtenido en estado sólido. Del mismo modo, si la concentración decrece respecto de la concentración óptima, la frecuencia de enlaces cruzados disminuye también, hasta que se llega a una concentración crítica mínima, por debajo de la cual ya no se detecta la formación de estos enlaces. No obstante, esta concentración crítica, a su vez, guarda una relación inversa con la masa molecular de la macromolécula irradiada, lo que da ya una idea de la complejidad del problema. Así por ejemplo, si la irradiación se lleva a cabo en un rango intermedio de concentración, los enlaces cruzados pueden aparecer

en una fase inicial pero una vez que, por efecto de la dosis, los procesos de degradación van reduciendo la masa molecular de los fragmentos presentes, la concentración crítica correspondiente resulta ser superior a la que realmente existe en esos momentos, razón por la que deja ya de observarse la formación de estos enlaces. En estas condiciones, por consiguiente, a altas dosis no tendrán lugar reacciones de enlaces entre cadenas.

La aparición de enlaces cruzados (fig.7), al igual que las rupturas dobles, afecta a la distribución de masas moleculares de la muestra irradiada. Por esta razón el acceso a su estudio desde un punto de vista experimental, se efectúa también en este caso desde esta perspectiva de variación de la masa molecular. Es

decir, conocidos M_n , M_w , M_{n_0} y M_{w_0} , se puede calcular la frecuencia de enlaces cruzados por nucleótido, C , según la siguiente expresión, propuesta también por Charlesby (32):

$$C = \frac{2m}{3} \left(\frac{1}{M_n} - \frac{2}{M_w} + \frac{2}{M_{w_0}} - \frac{1}{M_{n_0}} \right) \quad (1.26)$$

o bién, si únicamente se utilizan promedios en número de masa molecular, según la siguiente expresión, más sencilla:

$$C = \left(\frac{M_n}{M_{n_0}} - 1 \right) \frac{m}{M_n} = m \left(\frac{1}{M_{n_0}} - \frac{1}{M_n} \right) \quad (1.27)$$

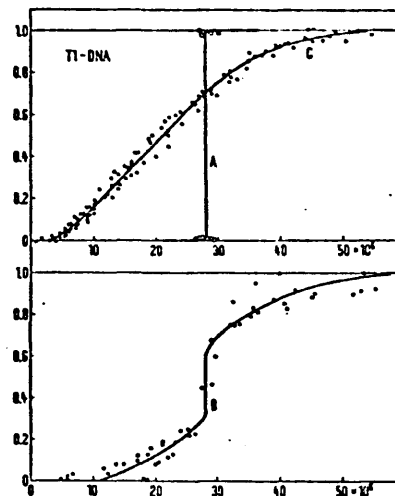


Fig. 7.- Distribuciones de DNA: control (A) e irradiado (B y C) (Coquerelle, 1.969)

1.4. MODIFICADORES DEL EFECTO DE LA RADIACION

Según se ha explicado ya en 1.1., uno de los campos que ofrecen mayor atención a los investigadores en el momento presente es el estudio de sustancias que puedan modificar los efectos de la radiación ionizante sobre los seres vivos.

Sea cual fuere la acción concreta de tales sustancias, resulta lógico pensar que en última instancia tengan alguna implicación sobre los procesos que se han explicado hasta aquí, referentes a la acción de la radiación sobre el DNA (8).

Dados los planteamientos del presente trabajo, lo que se expone a continuación hará referencia exclusivamente a los sensibilizantes. No se tratará aquí, por consiguiente, lo relativo a las sustancias radio-protectoras.

En 1.972 se estableció una clasificación de los radiosensibilizantes (44), aún vigente, tomando como criterio su modo de acción. Según esta clasificación, que no excluye la existencia de otras clases, ni implica que los grupos sean completamente independientes entre sí, los radiosensibilizantes se dividen en:

- Oxígeno-miméticos
- Análogos a los precursores del DNA
- Compuestos citotóxicos activados radioquímicamente
- Inhibidores de los procesos de reparación
- Agentes enlazantes e intercalantes del DNA
- Agentes que afectan a los niveles de grupos tiólicos en la célula

A continuación se describe cada uno de estos tipos, si bien de una forma breve, debido a que se trata de hipótesis complejas, aún no confirmadas plenamente en la mayor parte de los casos, remitiendo a la bibliografía cualquier consulta o ampliación (8) (44) (45).

- Oxígeno-miméticos

Se incluyen en este grupo aquellos compuestos que muestran un comportamiento similar al del O_2 en su acción radiosensibilizante. El interés de estas sustancias radica fundamentalmente en que la resistencia de ciertos tumores a la radiación se suele interpretar por la existencia en ellos de células hipóxicas.

Si bien hay puntos que permanecen bastante oscuros en relación con el modo de acción del O_2 y demás radiosensibilizantes de este grupo, en general, todos ellos son sustancias de una alta afinidad electrónica, propiedad que les hace capaces de captar los electrones solvatados y radicales inducidos a consecuencia de la radiación, aumentando así su vida media y radio de acción. En el caso de que esta interacción alcance a los radicales producidos sobre la molécula del DNA, podrían dar lugar además, a interferencias con los procesos de reparación.

La ventaja que suelen presentar estos oxígeno-miméticos frente al propio O_2 reside en su mayor capacidad de difusión por la población hipóxica, hecho que se debe a su más lenta destrucción metabólica.

- Análogos a los precursores del DNA

Pertenecen a este tipo ciertas pirimidinas halogenadas en las que el H de la posición 5 de una citosina o uracilo se sustituye por un halógeno.

Su acción estriba en que la célula es incapaz de distinguir las pirimidinas normales de las halogenadas, por lo que ambas se incorporan igualmente al DNA en el momento de su síntesis. Además, parece que facilitan la transmisión de la energía a lo largo de la cadena del ácido, produciendo un incremento considerable en el número de lesiones inducidas por la radiación. Su inconveniente radica en que no sensibilizan las células que no sintetizan DNA en ese momento y en que se incorporan por igual a células tumorales y normales.

- Compuestos citotóxicos activados radioquímicamente

Este grupo de radiosensibilizantes, quizá el menos implicado directamente con el DNA, incluye aquellas sustancias que, como consecuencia de la radiación, dan lugar a determinados derivados dentro de la célula, que resultan tóxicos para ésta.

- Inhibidores de los procesos de reparación

En este caso se trata de compuestos que interfieren en los procesos de reparación que poseen las células como defensa frente a las lesiones producidas por la radiación sobre el DNA.

La acción de estos sensibilizantes puede radicar tanto en la inactivación de los sistemas enzimáticos encargados de la reparación, como en una profunda alteración de la lesión inicial, de modo que ésta ya no pueda ser reparada por la célula.

Este tipo de radiosensibilizantes es objeto de una atención especial en estos momentos, porque entre otras cosas contribuirán a esclarecer los procesos implicados en el mecanismo de reparación.

- Agentes enlazantes e intercalantes del DNA

Los compuestos encuadrados en este grupo, además de que puedan producir la sensibilización por otros mecanismos, parecen intimamente relacionados con el grupo anterior. Y es que resulta fácil comprender que su acoplamiento a la molécula de DNA dificulte el acceso de algunas de las enzimas que intervienen en los procesos de reparación.

Este es, como se verá, el grupo que más directamente se encuentra relacionado con el presente trabajo.

- Agentes que afectan a los niveles de grupos tiólicos en la célula

Parece ser que los grupos SH que se encuentran en ciertas moléculas de la célula protegen a ésta de las radiaciones, por su capacidad para captar los radicales radioinducidos y producir compuestos estables. Conse

cuentemente, aquellas sustancias que sean capaces de combinarse con estos SH intracelulares disminuirán la capacidad protectora de la célula, dando lugar así a un efecto de sensibilización.

Resulta fácil comprender que, tanto la acción protectora de los SH como, por el contrario, su anulación por este tipo de sensibilizantes, tendrán una gran repercusión en relación con la acción del O_2 y demás sensibilizantes oxígeno-miméticos, hecho que pone de manifiesto la interrelación entre algunos de los mecanismos de acción de los radiosensibilizantes y, por tanto, las limitaciones de la clasificación anterior.

Los compuestos estudiados en este trabajo: un agente antimitótico, varios tipos de antibióticos y un complejo inorgánico de Pt que recientemente se ha revelado como un importante agente antitumoral se eligieron por varias razones. En primer lugar, por tratarse de sustancias que, según la información bibliográfica (46) (47) (48), se unen al DNA, siendo a su vez prototipos de distintas maneras de unión: intercalación, enlaces covalentes, interacciones de tipo iónico y enlaces aún no determinados de forma clara. En segundo lugar, porque existían datos sobre estos compuestos relativos a propiedades antitumorales o experimentos de irradiación, a diferentes niveles de complejidad biológica, que los hacían particularmente interesantes en relación con los objetivos de este trabajo.

A continuación se detallará en particular cada uno de estos compuestos.

1.4.1. Daunomicina

La daunomicina es un antibiótico con propiedades citotóxicas y antimitóticas (49), que se obtiene del "Streptomyces peucetius". Actualmente está clasificado como uno de los agentes más poderosos en el tratamiento de leucemias agudas (50) y ha sido objeto de estudio también en relación con los procesos de reparación celular (51).

Este antibiótico, junto con otros (nogalamicina, cinerubinas, pirromicinas, adriamicina ...) pertenece al grupo denominado "antraciclina" (52).

La estructura química y la configuración de la daunomicina se conocen actualmente con detalle (53) (fig. 8). Consta de un pigmento (daunomicinona) unido a un amino-azúcar (daunosamina), ambos fácilmente separables por hidrólisis.

Los principales efectos bioquímicos de la daunomicina, adriamicina y otros antibióticos similares están relacionados con los procesos de síntesis de los ácidos nucleicos, considerándose en la actualidad que es precisamente la unión directa de estos compuestos con el DNA la responsable de las interferencias que se observan cuando el DNA actúa como molde (54).

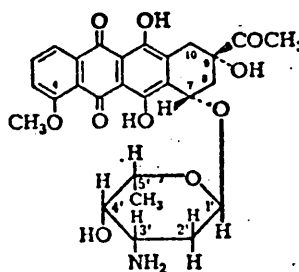


Figura 8.- Daunomicina

Son numerosas las pruebas que evidencian la unión entre el

DNA y la daunomicina. A continuación se hará una breve referencia de algunas de ellas, deducidas de diferentes estudios realizados (55)(56).

La presencia conjunta "in vitro" de DNA y daunomicina da lugar a que se observen ciertas alteraciones en las propiedades químico-físicas de ambas sustancias. Por parte del DNA se observa un descenso en el valor del coeficiente de sedimentación, un incremento en la viscosidad y cambios en el comportamiento relativo a los procesos de desnaturalización-renaturalización y actividad óptica. Por parte de la daunomicina se observan variaciones en su espectro de absorción, emisión fluorescente y comportamiento polarográfico.

Sin embargo, el DNA previamente tratado con desoxirribonuclease, el DNA apurínico o los derivados de pirimidina (nucleósidos, nucleótidos o bases libres) no presentan variaciones en sus propiedades químico-físicas cuando se añaden a una disolución de daunomicina. Sólo a altas dosis se observan algunos cambios en el espectro visible de estos derivados químicos, cambios que, de todos modos, son distintos a los observados en el DNA.

Los hechos anteriores se han de considerar, por consiguiente, como manifestaciones de la formación de un complejo entre la daunomicina y el DNA. En la formación de este complejo intervienen los siguientes factores (55): 1) integridad de la molécula del antibiótico; 2) grado de polimerización del DNA; 3) concentración de ambos compuestos; 4) relación molar DNA/daunomicina; 5) composición del disolvente.

Algunas de las variaciones observadas en ciertas propiedades

químico-físicas del DNA como consecuencia de la formación del complejo con la daunomicina, concretamente el aumento de viscosidad y la disminución en el coeficiente de sedimentación, se asemejan a las producidas por la acridina y otros compuestos que se intercalan entre las bases del DNA (57). Por este motivo, una de las primeras hipótesis sobre la naturaleza de la unión fue la de intercalación entre las bases nitrogenadas (56) (58).

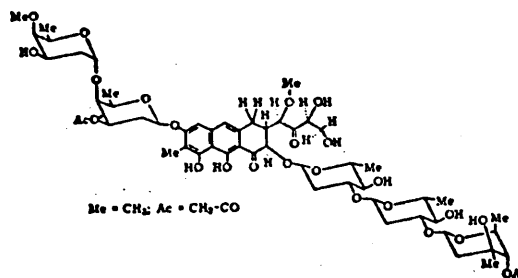
Sin embargo, existen también ciertas diferencias respecto al comportamiento de las acridinas, que evidencian que la unión es más fuerte que la que se produce por una simple intercalación del antibiótico entre las bases del DNA. Así por ejemplo, exceptuando el caso del $MgCl_2$, que a bajas concentraciones provoca la disociación del complejo, éste subsiste a fuerza iónica elevada y altas temperaturas, observándose incluso un aumento en la T_m del DNA (55).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, se ha propuesto la existencia simultánea de tres tipos de interacción, responsables de la estabilización del complejo (59). El primer tipo de interacción es de naturaleza electrostática, y tiene lugar entre el grupo amino protonado del azúcar y el grupo fosfato cargado negativamente. Un segundo tipo de interacción se produce por enlaces de hidrógeno, hecho que se demuestra por el efecto que sobre el complejo ejercen ciertas sustancias como formamida o urea. La tercera interacción corresponde al proceso de intercalación, el cual se ve favorecido por la estabilización hidrofóbica débil que tiene lugar entre la molécula intercalante y los pares de bases adyacentes y por la disminución que se observa en la repulsión entre los grupos fosfato cargados negativamente como resultado del incremento producido en las distancias entre los pares de bases.

1.4.2. Cromomicina A₃

La cromomicina A₃ es uno de los antibióticos que se obtienen del "*Streptomyces griseus*". Entre otras cosas es conocido por su actividad antitumoral frente a varios tipos de tumores experimentales (60), y ha sido usado incluso en terapéutica médica frente a ciertos cánceres humanos (61) con el nombre de "Toyomicin". Sin embargo, su aplicación clínica se ha visto limitada, debido a su toxicidad y a las propiedades inmunorrepresivas que presenta (62) (63).

Se suele considerar a la cromomicina A₃ como prototipo del grupo que forma junto con la mitramicina y la olivomicina, antibióticos con los que guarda una gran similitud, tanto en su estructura química como en lo referente a mecanismos de acción (46) (47).



En cuanto a su estructura química, la cromomicina A₃ está constituida por un pigmento central, la cromomicinona, y dos cadenas laterales, en las que entra a formar parte el azúcar cromosa (64) (fig. 9).

Figura 9.- Cromomicina A₃

La cromomicina A₃ forma complejos estables con el DNA nativo. La formación de estos complejos (que no se producen con el RNA) se pone de manifiesto por las alteraciones que se observan en el espectro visible del antibiótico, así como por los cambios producidos en la

densidad de flotación del DNA (56). Sin embargo, la viscosidad del DNA no experimenta cambios. Tampoco se observa variación en el valor de su coeficiente de sedimentación, a pesar de que se demuestra que el antibiótico sedimenta conjuntamente con el DNA (65). Este comportamiento hidrodinámico del complejo sugiere ya que la cromomicina A_3 no se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA (66). Por otra parte, el hecho de que el complejo pueda disociarse por extracción con disolventes orgánicos indica que en la unión tampoco existen enlaces de tipo covalente (67).

Al igual que en el caso de la actinomicina, la interacción entre el DNA y la cromomicina A_3 depende del contenido en guanina del DNA y de que éste se encuentre en estado nativo (68). Concretamente, parece que el grupo cromóforo del antibiótico requiere un grupo amino en posición 2 de una purina (69). Sin embargo, existen otros detalles que diferencian el comportamiento de la cromomicina A_3 del de la actinomicina, como lo ya mencionado acerca de la no intercalación, el hecho de que la T_m del DNA se incremente sólo a altas concentraciones de antibiótico (superiores a 100 $\mu\text{g/ml}$) y la necesidad de la presencia de cationes Mg^{2+} para que se forme el complejo (70) (71). En relación con esto último, el hecho de que las variaciones espectrales máximas se observen cuando el antibiótico y el catión Mg^{2+} se encuentran a una relación molar 1:1 (58) sugiere que previamente a la interacción DNA-antibiótico se produce la interacción cromomicina A_3 - Mg^{2+} , teniendo lugar algún fenómeno de isomerización en la parte cromófora del antibiótico.

No está clara aún la función de las cadenas laterales en la

unión, si bien parecen tener una influencia no despreciable en el proceso, posiblemente relacionada con los fenómenos de cooperatividad que se han observado en el curso de la formación del complejo (72).

1.4.3. Antramicina

La antramicina es un poderoso antibiótico derivado del "Streptomyces refuineus", que presenta propiedades bactericidas y antitumorales (73) (74) (75). Inhibe la síntesis de DNA y RNA en células de mamífero (76) y su estructura química (fig. 10) está confirmada por síntesis total (77).

Kohn y otros (76) demostraron que la antramicina reacciona "in vitro" con el DNA, si bien el complejo que se forma presenta ciertas características especiales, que lo diferencian de los habitualmente formados por unión no covalente entre el DNA y otros antibióticos. Este hecho hace que no esté esclarecida la naturaleza de la unión, aunque existen datos en favor de la hipótesis de que en ella se vea implicado algún tipo de enlace covalente lábil. En consistencia con este supuesto se hallan las observaciones que se hacen a continuación, procedentes del trabajo de Kohn y Spears (78).

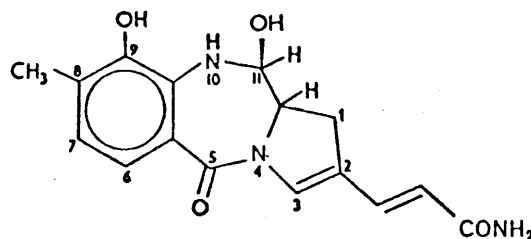


Figura 10.- Antramicina

La velocidad de reacción del antibiótico con el DNA es rela

tivamente lenta, resulta catalizada por los iones H^+ en un rango amplio de pH y disminuye con la fuerza iónica del medio. Los cationes divalentes Mg^{2+} y Mn^{2+} , sin embargo, reducen mucho más drásticamente esta velocidad, hecho que parece confirmar la existencia de algún tipo de unión específica de estos iones con el DNA.

Una vez formado, el complejo DNA-antramicina resulta particularmente estable. Resiste las diálisis prolongadas, precipitaciones con alcohol, filtraciones por gel, presencia de lauril sulfato o ión Ag^+ . No obstante, sí se observa su disociación a valores de pH inferiores a 3.

Un punto importante a considerar es que, si bien la formación del complejo produce una elevación de la T_m del DNA, no impide su desnaturalización por medio alcalino, observándose que la cromomina A_3 continúa unida a las cadenas simples después de que éstas se han separado. En estas condiciones no sería posible una reacción directa entre las cadenas simples y el antibiótico.

La antramicina parece mostrar una elevada especificidad por el DNA nativo. No reacciona frente a RNA ni desoximononucleótidos. Los polímeros del tipo del RNA, rG:rC, tampoco reaccionan con el antibiótico, mientras que, por el contrario, el dG:dC sí reacciona. Este último hecho pone de manifiesto la preferencia del antibiótico por estructuras del tipo del DNA. Se observa asimismo selectividad respecto a la se-

cuencia de bases del DNA, aunque este punto permanece aún bastante os
curo.

En relación con los DNA alterados por desnaturalización o alquilación extensiva, las velocidades de reacción con la antramycina se ven notablemente reducidas. La dependencia, en este caso positiva, de las velocidades de reacción del DNA desnaturalizado respecto de la fuerza iónica sugieren una sensibilidad de la reacción a la conformación.

Por último, la estabilidad química de la antramycina se ve notablemente incrementada una vez que forma parte del complejo.

Lo mencionado anteriormente, junto con el hecho de que la estrutura química de la antramycina, carente de estructura planar, puntos de carga o cadenas laterales, resulta peculiar respecto a otros antibióticos, hace que no se pueda pensar en un modelo obvio de unión con el DNA, teniéndose que rechazar, concretamente, las uniones por simple intercalación entre pares de bases o los enlaces de tipo iónico. Incluso, aunque las características anteriores sugieren la formación de un enlace covalente entre las dos moléculas, no resulta inmediatamente evidente, del estudio de la estructura del antibiótico, qué grupo podría ser el reactivo. Se ha encontrado, sin embargo, que los puntos libres 9 y 10 de la molécula de antramycina son necesarios, tanto para la interacción con el DNA como para su actividad biológica (79).

1.4.4. cis-diclorodiaminplatino (II) *

Como consecuencia del descubrimiento accidental de Rosenberg

(*) En adelante, para referirse al complejo $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2 \text{Cl}_2$ se usará la abreviatura DDP (diclorodiamin platino (II)).

en 1.964 (80), han sido numerosos los trabajos que se han realizado en relación con las propiedades antitumorales de determinados complejos de platino (81), especialmente el cis-DDP (82) (fig. 11), llegándose incluso en el caso de este último a su utilización en terapéutica clínica (83). No obstante, el uso médico de este complejo inorgánico se ha visto limitado a causa de su alta toxicidad. Por este motivo, actualmente se investiga de forma intensa en la síntesis de otros compuestos de platino (84), a fin de encontrar algún derivado nuevo que presente menor toxicidad para una actividad antitumoral similar o superior a la del cis-DDP.

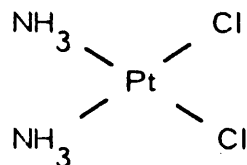


Fig. 11.- cis-diclorodiaminoplatino (II)

Existen en la bibliografía recientes revisiones sobre el cis-DDP (48) (85), así como trabajos relacionados con la radiación (86) (87).

En la actualidad se admite, en general, que las propiedades antitumorales del cis-DDP son consecuencia de su unión al DNA, unión que se realiza directa e irreversiblemente a través de sus bases nitrogenadas. De todos modos, y si bien parecen conocerse algunas características sobre esta unión, los datos que se poseen distan aún mucho de explicar satisfactoriamente la inhibición del proceso de replicación del DNA (88) y, consiguientemente, la detención de la división celular. Existen incluso datos en favor de una posible unión con el DNA que se encuentra en la superficie de la célula tumoral (89), unión que ayudaría a un más rápido reconocimiento y posterior destrucción de la célula por parte del sistema inmunológico (90).

El hecho de que los desplazamientos característicos que se observan en el espectro del DNA como consecuencia de la unión de esta molécula con el cis-DDP se vean reducidos en presencia de concentraciones elevadas de iones Cl^- en el medio (91) sugiere que la especie realmente reactiva ha de ser algún ión complejo cargado positivamente, resultante de la pérdida de uno o ambos ligandos $-\text{Cl}$ del cis-DDP. De ser esto así, el medio intracelular resultaría ser mucho más favorable para la disociación de los Cl^- del cis-DDP, por tener una concentración (10^{-3} M) muy inferior a la correspondiente concentración en el plasma (10^{-1} M) (92). Ahora bien, todo esto es posible, tanto para el isómero cis como para el isómero trans del DDP, y, sin embargo, las propiedades antitumorales y la capacidad de inhibición de la replicación del DNA fueron descubiertas como exclusivas del isómero cis (48). Los factores estéricos parecen, por tanto, tener una especial importancia en este caso.

Teniendo en cuenta las distancias interatómicas entre los distintos grupos del cis-DDP y del DNA se han propuesto modelos de unión que estén en concordancia con los resultados experimentales (85). El modo predominante de unión parece ser una reacción bifuncional del complejo de platino, una vez que ha perdido los dos iones Cl^- , con las posiciones N-7 de dos bases guanina adyacentes. Se trataría, por tanto, de uniones intracadena dentro de una misma molécula de DNA.

La posibilidad de unión intercadena dentro de la propia molécula de DNA parece presentarse con mucha menor frecuencia (88), estando exclusivamente reservada a enlaces entre dos grupos amino en posición 6 pertenecientes a adeninas situadas en cadenas opuestas.

1.4.5. Mitomicina C

La mitomicina C (fig. 12) es un antibiótico aislado por primera vez en 1.956 por Wakiki y otros (93) a partir del "Streptomyces caespitosus". Se observó pronto su actividad bactericida y antitumoral(94),

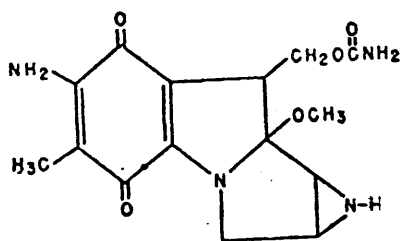


Figura 12.- Mitomicina C

y actualmente se le puede considerar como representativo de los antibióticos que se unen al DNA mediante enlace covalente. En la bibliografía se puede consultar una revisión detallada efectuada por Szybalski e Iyer (95) sobre su mecanismo de acción, así como varios trabajos en los que la mitomicina C se ha estudiado como sensibilizante de la radiación (96) (97).

Prevía reducción enzimática o química, la mitomicina C forma enlaces con varios tipos de moléculas biológicas (98), hecho que se debe considerar a la hora de intentar explicar su actividad biológica. Sin embargo, es evidente que el interés principal de este antibiótico radica en su capacidad para unirse directamente al DNA.

La mitomicina C, una vez activada, forma enlaces covalentes entre las cadenas complementarias del DNA (99). El número de estas uniones que se observan "in vitro" con DNA purificado depende de la relación antibiótico/DNA en la incubación y es muy superior al que se produce cuando el antibiótico se pone en contacto con organismos biológicos (99). Estas investigaciones, por otra parte, indican que aproximadamente de cada 5 ó 10 moléculas de antibiótico que se unen al DNA só-

lo una forma un enlace cruzado entre las cadenas complementarias, quedando el resto unido a una base de una de las cadenas sencillas mediante alquilación monofuncional. Aunque está probada la naturaleza covalente de estos enlaces (94), no parece completamente esclarecido el tipo de especies reactivas a que da lugar la mitomicina C (100) (101), ni los lugares exactos de las bases en donde se producen las uniones. No obstante hay datos que señalan una preferencia por las bases guanina (94) concretamente en su posición N-7 (102).

Una de las consecuencias de la formación de estos enlaces entre las cadenas complementarias es que queda impedida la completa desnaturalización del DNA (99).

Precisamente las propiedades letales que presenta este antibiótico "in vivo" se explican asimismo desde esta perspectiva de la formación de enlaces entre las cadenas complementarias del DNA, enlaces que imposibilitan la separación de las dos cadenas en el proceso de replicación, y consiguientemente la síntesis del DNA (103).

1.4.6. Cloroquina

La cloroquina (fig. 13) puede considerarse como prototipo de las 4-aminoquinoleínas, compuestos conocidos desde hace tiempo por sus propiedades antimaláricas (104).

Parker e Irvin, en 1.952 (105), fueron los primeros en observar que el espectro de absorción de

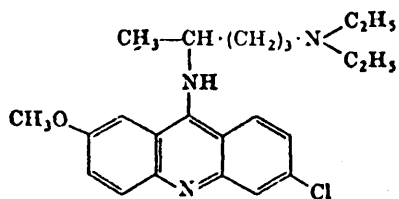


Figura 13.- Cloroquina

la cloroquina se ve alterado en presencia del DNA. Posteriormente (106) se vió que la cloroquina y otros antimaláricos (mepacrina, quina) inhibían la incorporación de ^{32}P al DNA y RNA. Asimismo estos compuestos son poderosos inhibidores de la DNA polimerasa en sistemas celulares (107) (108), hecho que según se admite actualmente de forma general, se debe precisamente a su unión directa con la molécula del DNA, unión que asimismo se observa con determinadas 8-aminoquinoleínas (primaquina, pamaquina...) (109).

Recientemente se ha estudiado la acción conjunta de la radiación y la cloroquina a nivel celular (110), encontrándose efectos radiosensibilizantes, que han sido atribuidos a una inhibición de los procesos de reparación por parte de la cloroquina (111).

Teniendo en cuenta que la unión de la acridina con el DNA se realiza mediante intercalación entre las bases (57), y que la cloroquina posee en parte una estructura planar, Hahn y otros (112) propusieron, como consecuencia de los estudios que realizaron sobre propiedades hidrodinámicas y ópticas del complejo DNA-cloroquina, que en la formación de éste se produciría también una intercalación del anillo de quinoleína entre las bases del DNA. Si bien los datos que obtuvieron experimentalmente no hacían referencia a la función de la cadena lateral de 1-4 diaminopentano en esta unión, sugirieron que las diaminas alifáticas y la espermina podrían considerarse como modelos de esta cadena lateral de la cloroquina. Efectivamente, las diaminas alifáticas estabilizan al DNA, estando relacionado este efecto con la distancia entre los dos grupos amino primarios (113). La espermina, conteniendo dos grupos amino secundarios separados por 4 átomos de

carbono, resulta ser tan efectiva como la cloroquina en relación con la elevación de la temperatura de fusión del DNA (114), e inhibe también a la DNA y la RNA polimerasa.

Se sugirió entonces que las aminas alifáticas se unirían iónicamente con los grupos fosfato del esqueleto polipeptídico (115), y que, por consiguiente, de una forma análoga, la cadena lateral de la cloroquina, quedando fuera del entorno (116) de los pares de bases entre los que se produce la intercalación del anillo de quinoleína, interactuaría con los grupos fosfato de las cadenas complementarias a lo largo del surco menor de la doble hélice. Este modelo de unión ha sido posteriormente criticado por Yielding y otros (117), quienes proponen una nueva forma de unión en la que si bien la cadena lateral de la cloroquina interacciona en la forma vista anteriormente, el anillo de quinoleína podría interaccionar con otros anillos de la misma cloroquina por apilamiento o, eventualmente, con las bases que se asoman al surco mayor de la doble hélice.

Estudios llevados a cabo con análogos de la cloroquina revelaron que tanto la actividad antimalárica como su afinidad por el DNA varían con la longitud de la cadena lateral en cuestión. La presencia de esta cadena es, por otra parte, necesaria para que se produzca un enlace fuerte, y los estudios realizados sobre distancias interatómicas demuestran que presenta unas condiciones óptimas para unirse electrostáticamente con dos grupos fosfato (112).

II. MATERIALES Y METODOS, EXPERIMENTALES Y DE CALCULO

2.1. TRATAMIENTOS BASICOS DEL DNA

2.1.1. Obtención y aislamiento

En el presente trabajo se utilizó siempre DNA de timo de ternera.

Para proceder a su obtención, se extirpó el timo de un animal recién sacrificado, e inmediatamente la glándula se trasladó congelada al laboratorio.

El proceso de aislamiento del DNA se llevó entonces a cabo según el método de Kay y otros (118), ligeramente modificado, de acuerdo con los pasos que se indican a continuación.

Se trocean 50 g aproximadamente de la glándula y se homogeneizan durante unos minutos con 200 ml de SSC (NaCl 0,15 M + citrato trisódico 0,015 M). La suspensión resultante se centrifuga a 12.000 xg durante 10 min a 0°C. Sobre el sedimento obtenido se repite tres veces la homogeneización y centrifugación con 200 ml de NaCl 0,14 M.

A continuación se procede a la separación de las proteínas, añadiendo 130 ml de SDS (dodecil sulfato sódico) al 5% en etanol. Se agita durante 3 horas, transcurridas las cuales se eleva la concentración de NaCl a 1 M con producto sólido y se continúa la agitación hasta su disolución completa. El enturbiamiento que se observa entonces se debe a la precipitación de las proteínas. Se centrifuga esta solución a 30.000 xg durante 1 hora y finalmente se elimina el sedimento de proteínas.

Al sobrenadante se le añade entonces un volumen igual de

etanol al 95%, con lo que se produce la primera precipitación de DNA, el cual se recoge, en forma de fibras blancas, haciendo girar una varilla de vidrio.

El paso siguiente es la purificación de este DNA. Para ello se redisuelve lentamente en 700 ml de NaCl 10^{-4} M. Cuando está completamente disuelto, se añaden 80 ml de SDS y se agita durante 1 hora. Nuevamente se eleva la concentración de NaCl a 1 M con producto sólido y se centrifuga durante un mínimo de 2 horas. El sobrenadante se decanta del resto precipitado y de nuevo se precipita el DNA con un volumen igual de etanol al 95%.

Todo el proceso de la etapa anterior se repite nuevamente y las fibras de DNA obtenidas en el precipitado de esta segunda purificación se lavan varias veces con acetona hasta que en ésta no se observe turbidez.

Se seca el producto y se guarda en nevera, a 4° C, en ambiente seco.

El rendimiento de este método, en el que, por las características del tejido utilizado se hace innecesaria la existencia de un proceso de eliminación de RNA, es aproximadamente de un 10% en peso seco.

2.1.2. Conservación y disolución

Se prestó una especial atención a este punto, debido a que el DNA, además de presentar como cualquier otro material biológico

una gran delicadeza en cuanto a su conservación, plantea otra serie de problemas, más específicos, derivados de su excepcional tamaño molecular. Estos problemas se manifiestan principalmente en la exagerada lentitud de los procesos de disolución del DNA sólido y en su fragilidad respecto a cualquier tratamiento mecánico brusco que comporte fuerzas tangenciales (119), a consecuencia de las cuales se produce una disminución en su masa molecular.

Por todo ello, se tomaron las debidas precauciones en relación con la permanencia de las disoluciones a temperatura ambiente y los procesos mecánicos de pipeteo, agitación, etc. Asimismo se procuró evitar, tanto las reiteradas disoluciones del DNA sólido como, por el contrario, el almacenamiento prolongado de las mismas, especialmente las diluídas. Para cumplir este objetivo, se preparó cada cierto tiempo una disolución concentrada de DNA, a partir de la cual se preparaban las disoluciones de trabajo en el momento oportuno. La preparación de esta disolución concentrada de partida se hizo de acuerdo con los pasos que se indican a continuación.

Se pesa una pequeña porción del DNA sólido con objeto de obtener 50 ml de disolución a una concentración superior a 700 $\mu\text{g/ml}$ y se deja durante un día con sólo unas gotas de NaCl 0,01 M. Después, y progresivamente, se van añadiendo cantidades cada vez mayores del mismo disolvente, hasta llegar a un total de 50 ml. Este proceso dura varios días, durante los cuales se procura evitar toda agitación. Finalmente, la disolución se dializa frente al disolvente común de trabajo (NaCl 0,2 M + tampón fosfatos 0,025 M, pH 7,3) en el que se incluye EDTA 10^{-4} M. La adición de este agente quelante tiene como finali-

dad la captura de los posibles iones Mg^{2+} que hubiera en el medio, los cuales activarían cualquier resto de DNAsas que quedara como impureza, observándose con el tiempo una degradación del DNA. (En los casos en que el modificador de la radiación estudiado requirió en algún proceso la presencia de iones Mg^{2+} , la alícuota correspondiente tomada de la disolución de partida se dializó nuevamente frente al disolvente común de trabajo con objeto de eliminar el EDTA).

La concentración de esta disolución de partida de DNA se determinó por lectura espectrofotométrica y para su almacenamiento se añadieron siempre unas gotas de cloroformo, con objeto de impedir todo posible crecimiento bacteriano (120) (121).

Los procesos anteriores se realizaron siempre en cámara fría, a $8^{\circ} C$.

2.1.3. Desnaturalización

La desnaturalización del DNA se llevó siempre a cabo por el método alcalino de Davison y otros (122).

Según este método, a 1 vol. de muestra de DNA en solución se le añade 1 vol. de NaOH 0,2 M, con lo que se produce la desnaturalización. Después de 30 sg a temperatura ambiente, y con el fin de impedir la renaturalización, se añade 1 vol. de formaldehído al 37%. Por último, y para neutralizar, se añade 0,13 vol. de K_2HPO_4 1M.

En el presente trabajo las muestras así desnaturalizadas se

dejaban dializando durante la noche frente al disolvente común conteniendo un 2% de formaldehído, medio en el que siempre se realizaron todas las caracterizaciones posteriores de ultracentrifugación y medidas espectrofotométricas.

2.2. MODIFICADORES DEL EFECTO DE LA RADIACION

2.2.1. Daunomicina

Se preparó inicialmente una disolución de DNA en disolvente común a una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$, eliminando todo resto de EDTA procedente de la disolución concentrada de partida mediante diálisis frente al disolvente común.

Por otra parte, se realizaron experimentos de prueba de formación del complejo a relaciones DNA: antibiótico de 3,5:1 y 8,7:1 (55), resultando ser esta última relación la más ajustada a los propósitos del trabajo.

En consecuencia, se preparó una disolución de daunomicina $1,52 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ en el disolvente común, y se mezclaron posteriormente volúmenes iguales de esta disolución y de la disolución de DNA. Se obtuvo así una disolución de complejo, en la que, manteniendose la relación anterior, la concentración en DNA fue de 200 $\mu\text{g/ml}$, la habitual en el momento de la irradiación.

La irradiación del complejo se llevó a cabo suministrando dosis de: 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 y 27 Krad. Una parte de las alícuotas correspondientes al control y a cada una de las dosis se destinó directamente a su estudio de sedimentación, sin disociación del complejo, mientras que otra parte se sometió a diálisis antes de ser centrifugada. Asimismo se reservaron fracciones destinadas a desnaturalización y estudios espectrofotométricos.

El procedimiento seguido con las muestras destinadas a diálisis consistió en una primera dilución con un volumen igual de disolvente común conteniendo MgCl_2 0,4 M. Posteriormente se sometieron las muestras a diálisis prolongadas frente a concentraciones cada vez menores de MgCl_2 en el mismo disolvente, hasta que los últimos cambios de medio correspondieron a disolvente común.

Los cálculos de sedimentación correspondientes a las muestras irradiadas se hicieron siempre frente a controles que hubieran seguido idéntico proceso.

2.2.2. Cromomicina A_3

Se preparó una disolución inicial de DNA en disolvente común a 400 $\mu\text{g/ml}$, eliminando los restos de EDTA procedentes de la disolución concentrada de partida mediante diálisis frente a disolvente común.

Por otra parte se prepararon: una disolución de cromomicina A_3 y una disolución de MgCl_2 , ambas en disolvente común y a una concentración $6 \cdot 10^{-5}$ M, mezclándose a continuación volúmenes iguales de estas dos disoluciones.

Del mismo modo, se mezclaron posteriormente volúmenes iguales de la disolución de DNA y de la disolución correspondiente al complejo cromomicina $A_3\text{-Mg}^{2+}$, incubándose esta nueva mezcla a 37°C durante 15 min (67). Tanto antes como después de la incubación se separaron alícuotas destinadas a su lectura en el espectrofotómetro.

Procediendo de esta manera se consigue que en el complejo la concentración de DNA sea la habitual del momento de la irradiación, 200 $\mu\text{g/ml}$, siendo por otra parte de $1,5 \cdot 10^{-5}$ M la concentración, tanto para la cromomicina A_3 como para el ión Mg^{2+} .

Las dosis de radiación suministradas fueron de: 4, 6, 9, 12, 16, 18, 21, 22 y 24 Krad. Las alícuotas correspondientes a cada dosis se dividieron en distintas porciones, destinadas a experimentos de lecturas en el espectrofotómetro, desnaturalización y ultracentrifugación.

Debido a que la cromomicina A_3 no produce variaciones en el coeficiente de sedimentación del DNA (véase 1.4.2.) no se procedió, en este caso, a disociar el complejo por diálisis en las muestras destinadas a los experimentos de sedimentación.

2.2.3. Antramicina

Se preparó inicialmente una disolución de partida de antramicina en el disolvente común de trabajo a una concentración de 31,6 mg/l, incubándose durante 1 hora a 37°C , con objeto de conseguir un espectro estable (78).

Por otra parte, se preparó una disolución de DNA en el disolvente común a una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$.

Con el fin de formar el complejo DNA-antramicina, se mezclaron volúmenes iguales de las disoluciones anteriores, incubándose la mezcla a 26°C durante 100 min, tiempo de incubación que se consi-

deró óptimo, después de haberse efectuado varios experimentos de prueba a este respecto. Procediendo de esta manera se obtuvo una disolución de complejo que presentaba una concentración en DNA de 200 $\mu\text{g/ml}$, la habitual en el momento de la irradiación, y una concentración en antramicina de 15,8 mg/l.

En la irradiación del complejo DNA-antramicina se suministraron dosis de: 6, 12, 18, 20, 24, 26, 32 y 38 Krad. Las alícuotas correspondientes al control y a cada una de las dosis se dividieron en porciones, con objeto de realizar estudios espectrofotométricos, diálisis, desnaturalización y sedimentación.

La escasa efectividad de las diálisis en relación con la disociación del complejo, confirmada por estudios espectrofotométricos, obligó a realizar los experimentos de sedimentación con muestras no dializadas. De todos modos, los cálculos posteriores relativos a las muestras irradiadas se hicieron en todo caso frente a controles que sufrieron idéntico proceso.

2.2.4. cis-diclorodiaminplatino (II)

Se preparó inicialmente una disolución de DNA a 400 $\mu\text{g/ml}$ en $\text{NaCl } 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, eliminando los restos de disolvente de la disolución concentrada de partida mediante diálisis frente al nuevo disolvente. Este cambio de medio se hizo con el fin de evitar la interferencia de concentraciones elevadas de iones Cl^- en la formación del complejo (véase 1.4.4.).

Por otra parte, se preparó una disolución de cis-DDP en agua destilada, a una concentración de $6,7 \cdot 10^{-4}$ M.

Con objeto de formar el complejo DNA-cis-DDP se mezclaron volúmenes iguales de las disoluciones anteriores y se incubó la mezcla durante 7 horas a 37° C (91). De este modo, se consiguió una relación Pt/P = 0,5 en el complejo, quedando el DNA a una concentración de 200 μ g/ml, que fue la habitual en el momento de la irradiación.

A esta disolución de complejo se le suministraron unas dosis de: 6, 12 y 18 Krad. Las alícuotas correspondientes al control no irradiado y a cada una de las dosis fueron divididas en porciones, con objeto de realizar lecturas espectrofotométricas, diálisis, desnaturación y centrifugación.

Previamente a los experimentos de sedimentación, las muestras se dializaron frente al disolvente común de trabajo, con objeto de que la sedimentación se desarrollara en las condiciones habituales de disolvente.

2.2.5. Mitomicina C

Se preparó una disolución de DNA en disolvente común a 400 μ g/ml.

Por otra parte, se preparó una disolución de mitomicina C a una concentración de 0,2 mg/ml, también en el disolvente común de trabajo.

Debido a que la mitomicina C da lugar a enlaces entre las cadenas complementarias dentro de la propia molécula de DNA (véase 1.4.5.), y que este hecho plantea consiguientemente problemas a la hora de la desnaturalización, se optó, en el caso de este compuesto por estudiar sólo el efecto de su presencia en el momento de la irradiación, renunciando así a la activación necesaria para la formación del complejo.

Se mezclaron entonces volúmenes iguales de las disoluciones anteriores, con lo que se obtuvo una mezcla en la que la concentración de DNA fue la habitual en el momento de la irradiación (200 $\mu\text{g/ml}$) y la de mitomicina C, de 0,1 mg/ml.

La irradiación se llevó a cabo en las condiciones habituales suministrándose dosis de: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 Krad. Las alícuotas correspondientes a cada dosis, junto con una del control no irradiado, se dividieron en porciones, destinadas a estudios espectrofotométricos, diálisis, desnaturalización y sedimentación.

En un experimento final se realizó el estudio espectrofotométrico de las variaciones observadas al irradiar por separado muestras de mitomicina C, DNA y DNA + mitomicina C, en las mismas condiciones de concentración y dosis que en los casos anteriores.

2.2.6. Cloroquina

Se preparó inicialmente una disolución de DNA en disolvente común a 400 $\mu\text{g/ml}$.

Por otra parte, se preparó una disolución de cloroquina $8 \cdot 10^{-4}$ M también en disolvente común.

Se mezclaron volúmenes iguales de estas dos disoluciones, con lo que se obtuvo una disolución de complejo DNA-cloroquina en la que la concentración de DNA fue la habitual en el momento de la irradiación, 200 $\mu\text{g/ml}$, y la de cloroquina, de $4 \cdot 10^{-4}$ M.

La irradiación se llevó a cabo suministrando dosis de: 12, 15, 18, 21, 27, 30, 39 y 45 Krad. Las alícuotas correspondientes a cada dosis, junto con la del control no irradiado, fueron divididas en porciones destinadas a experimentos de lectura espectrofotométrica, diálisis, desnaturalización y ultracentrifugación.

Antes de efectuar los estudios de sedimentación, se procedió a la disociación del complejo, con objeto de eliminar de éste la cloroquina. Ello fue debido a que la cloroquina, al presentar absorbancia a 260 nm y modificar ligeramente el valor del coeficiente de sedimentación del DNA (véase 1.4.6.) podría interferir en el momento de la centrifugación.

Las diálisis se llevaron a cabo frente a disolvente común conteniendo inicialmente $\text{MgCl}_2 \cdot 10^{-2}$ M. En los cambios de medio posteriores se redujo progresivamente la concentración de MgCl_2 , hasta que finalmente la diálisis se efectuó frente a disolvente común. El tiempo total de diálisis necesario para la eliminación de la cloroquina del complejo no fue nunca superior a 48 horas.

2.3. IRRADIACION DE LAS MUESTRAS

La irradiación de las muestras se efectuó en la Junta de Energía Nuclear utilizando un tubo de rayos X Isomatix, Modelo Milán, de 250 Kv.

2.3.1. Condiciones de la irradiación

Antes de cada irradiación se procedía al calibrado del aparato, con objeto de obtener unas condiciones de flujo constantes, de aproximadamente 200 rad/min, fijando el voltaje (250 Kv), amperaje (8 mA), filtro (1 mm de Cu) y distancia desde la boca del tubo a la muestra (5 cm).

En el momento de la irradiación, la concentración de DNA en las disoluciones, tanto si se encontraba libre como si formaba parte de un complejo, fue siempre de 200 μ g/ml. Se eligió esta concentración porque, además de encontrarse en otros trabajos sobre irradiación de DNA (33) (34) (37) (123) (124), resultó ser la mínima posible, habida cuenta de los procesos de dilución, desnaturalización y diálisis que posteriormente siempre tenían lugar. El disolvente fue el común de trabajo, con la única excepción del caso del cis-DDP (véase 2.2.4.).

El recipiente de irradiación fue siempre un vaso de vidrio cilíndrico, de 4 cm de diámetro y 2,5 cm de altura. Previamente a cada irradiación se lavaba con mezcla crómica, con objeto de evitar toda posible contaminación con materia orgánica.

Las muestras se trasladaban en un recipiente con hielo, si bien la irradiación se efectuó siempre a temperatura ambiente.

2.3.2. Dosimetría

El control de las dosis suministradas se efectuó por dosimetría Fricke (125), en las mismas condiciones en que se irradiaban las muestras.

La aplicación de las distintas dosis se consiguió separando alícuotas a diferentes tiempos.

Aunque en el presente trabajo las dosis suministradas cubrieron un rango entre 4 y 50 Krad, en el estudio particular de cada modificador, las dosis estuvieron logicamente condicionadas por las características de radiosensibilidad presentadas por el propio modificador.

2.4. TECNICAS DE MEDIDA

2.4.1. Ultracentrifugación analítica

Las medidas de velocidad de sedimentación se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman, Modelo E, dotada de monocromador, multiplexer, sistema de detección fotoeléctrica y registro gráfico (126). Estos elementos permiten, una vez que se ha seleccionado una longitud de onda (entre 200 y 2000 nm), centrifugar dentro de un mismo experimento, hasta 5 células distintas, las cuales se pueden reconocer por separado en el registro gráfico que se efectúa simultáneamente.

2.4.1.1. Condiciones de centrifugación

La velocidad de centrifugación fue de 20.000 r.p.m. en los estudios de caracterización del DNA nativo y desnaturalizado, así como en todos los experimentos posteriores de centrifugación de DNA nativo. En los casos de DNA irradiado y posteriormente desnaturalizado, la velocidad se incrementó a 36.000 r.p.m.

En experimentos iniciales de prueba, realizados a diferentes velocidades de giro, se puso de manifiesto que las velocidades anteriores eran las más adecuadas para el intervalo de masas moleculares con que se trabajó, permitiendo efectuar un número suficiente de registros. Por otra parte, y como era de prever (127), a esas velocidades no se observaron, dentro del margen de error experimental del instrumento ($\pm 0,1 S$), efectos de influencia de la velocidad en el valor de los coeficientes de sedimentación.

El rotor utilizado en todos los experimentos fue del tipo An G de Titanio, con 6 orificios, en los que se alojaban un contrapeso y las 5 células, siendo éstas de sector doble y pieza central Kel-F.

Las disoluciones se introducían en el sector A de las células (126) mediante una jeringuilla desprovista de aguja, con objeto de evitar al máximo las posibles degradaciones del DNA por fuerzas tangenciales. El sector B de la misma célula se destinaba al disolvente, cuidando siempre de introducir una cantidad de éste ligeramente superior a la de disolución, con objeto de asegurar que a lo largo del registro quedara restada la absorbancia debida al disolvente.

El proceso de sedimentación se siguió mediante sistema óptico de absorción a una longitud de onda de 265 nm, la cual permite disponer de mayor cantidad de luz que a 260 nm sin, por otra parte, alejarse demasiado del máximo del DNA (126) (128). La calibración en el registro gráfico vino dada por cinco escalones, proporcionados por el sistema electrónico, correspondientes cada uno de ellos a un incremento de absorbancia de 0,2 U.D.O.

En cada experimento, el número mínimo de registros fue de 6 para cada célula, lo que supuso, en general, un tiempo de sedimentación de 120 min aproximadamente, comenzándose a efectuar el primer registro una vez transcurridos los primeros 5 minutos de centrifugación.

En los casos en que se centrifugó DNA irradiado y posteriormente desnaturalizado, la mayor velocidad de sedimentación del control respecto de las demás muestras obligó, en general, a efectuar el registro de la célula control de una forma completa, o casi completa, antes que

los de las demás células.

La velocidad de barrido del monocromador fue de 0,21 mm/sg y la velocidad del papel de registro fue de 1 mm/sg, excepto en los registros destinados al estudio de distribuciones de coeficientes de sedimentación, en los que la velocidad del papel se aumentó a 5 mm/sg.

La apertura de la rendija del fotomultiplicador, la escala de la sensibilidad y el filtrado de ruido del registro se regularon en cada caso con objeto de obtener el mínimo de distorsión sin perjuicio de la sensibilidad.

2.4.1.2. Cálculo de coeficientes de sedimentación

En la fig. 14 se presenta esquemáticamente la correspondencia entre el doble sector de una célula de la ultracentrífuga y su registro gráfico a un tiempo determinado.

El registro consiste en una evaluación de la distribución de concentración a lo largo de la célula mediante sistema óptico de absorción. En él pueden observarse una línea de referencia interna, LRI, y una línea de referencia externa, LRE, correspondientes a las respectivas referencias proporcionadas por los dos orificios del contrapeso

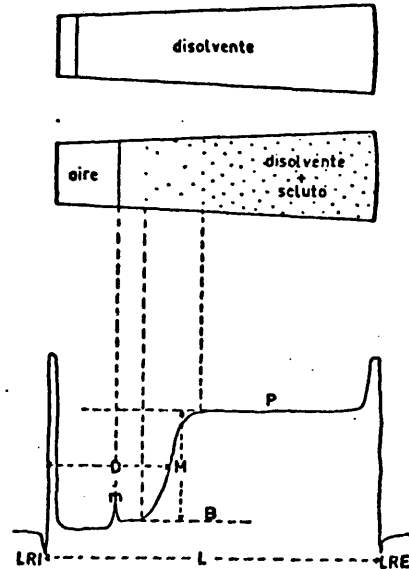


Fig. 14.- Correspondencia célula-registro

a distancia fija conocida. El pico m es la señal correspondiente al menisco, o límite aire-líquido. La línea base, B , la proporciona la absorbancia debida al disolvente, y la meseta superior, P , corresponde a la zona de máxima absorbancia de la disolución. El perfil creciente que se observa entre la línea base y la meseta refleja el gradiente de concentración formado por el frente de sedimentación, el cual separa la región que contiene moléculas de soluto y la zona en que, como consecuencia de la sedimentación ya sólo queda disolvente.

Para proceder al cálculo del coeficiente de sedimentación correspondiente al 50% de concentración del gradiente (129) (130) (131) (132), también denominado coeficiente de sedimentación medio, o simplemente "coeficiente de sedimentación", s , se determina en primer lugar, sobre el perfil del frente de sedimentación, el punto medio, M , entre la línea base y la meseta.

A continuación, se mide la distancia en cm, D , entre este punto y la LRI, distancia que hay que transformar en distancia real dentro de la célula, d , multiplicándola por el factor de conversión correspondiente. Este factor de conversión es la relación entre la distancia real existente entre los orificios de referencia del contrapeso, 1,6 cm, y su correspondiente distancia en la gráfica, L , entre las referencias LRI y LRE.

$$d = D \cdot \frac{1,6}{L} \quad (2.1)$$

En el presente trabajo resultó siempre más cómodo efectuar todas las medidas correspondientes a cada célula respecto de una refe-

rencia interna común que coincidiera con una de las líneas del papel milimetrado del registro, introduciéndose en el programa de cálculo las correcciones oportunas (véase 2.5.1.).

El paso siguiente consiste en calcular las distancias reales, r , al eje de giro. Para ello, a los valores de d anteriormente obtenidos se les suma la distancia que hay desde el eje de giro al orificio interno del contrapeso, valor que en el aparato, por no existir distorsión de rotor en el intervalo de velocidades empleado, fue siempre de 5,70 cm.

$$r = d + 5,70 \text{ cm} \quad (2.2)$$

Finalmente se hallan los logaritmos neperianos de los valores anteriores y se representan gráficamente frente a sus respectivos tiempos registrados en minutos. A partir de esta representación gráfi-
ca resulta inmediato el cálculo del coeficiente de sedimentación, cálculo que, como se verá más adelante, sólo corresponde todavía a un coeficien-
te de sedimentación aparente.

Teniendo en cuenta la definición del coeficiente de sedimenta-
ción (129):

$$s = \frac{dr/dt}{\omega^2 r} \quad (2.3)$$

la expresión que, por integración de la anterior permite calcular el coe-
ficiente de sedimentación aparente, siempre que éste se mantenga constan-
te durante el proceso de sedimentación, viene dada por:

$$\ln r = \ln r_0 + s_{ap} \omega^2 \cdot 60 \cdot t \quad (2.4)$$

en donde s_{ap} es el coeficiente de sedimentación aparente, ω la velocidad angular en rad/sg, t el tiempo en min y r la distancia radial en cm. Por consiguiente, la representación gráfica mencionada anteriormente de $\ln r$ frente a t corresponde en este caso a una recta, de cuya pendiente se deduce fácilmente el s_{ap}

$$s_{ap} = \frac{\text{pendiente}}{60 \omega^2} \quad (2.5)$$

Dividiendo este valor, que viene expresado en segundos, por 10^{-13} , se obtiene el coeficiente de sedimentación expresado en unidades "svedberg", S .

En el presente trabajo, esta fue la manera en que se realizó el cálculo de s_{ap} , debido a que la representación gráfica anterior siempre se ajustó a una línea recta (véase 3.1.1.).

Ahora bien, la denominación de "aparentes" hace referencia al hecho de que los coeficientes de sedimentación así calculados, debido a que están medidos en unas condiciones determinadas de disolvente, temperatura y concentración, factores que a su vez influyen en su valor, precisan todavía de ciertas correcciones.

El coeficiente de sedimentación correspondiente a condiciones estandarizadas de disolvente y temperatura (agua y 20° C. respectivamente), se calcula según la siguiente expresión (129) (130) (132):

$$s_{20,w}^c = s_{ap}^c \cdot \frac{\eta_{t,w}}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{\eta_{t,sv}}{\eta_{t,w}} \cdot \frac{1-\bar{v}_{20,w} \cdot \rho_{20,w}}{1-\bar{v}_{t,sv} \cdot \rho_t} \quad (2.6)$$

donde η es la viscosidad, ρ la densidad y \bar{v} el volumen específico del DNA; los subíndices 20 y t se refieren a 20° C y a la temperatura de experimentación, respectivamente; sv se refiere al disolvente, w al agua y el superíndice c a la concentración a la que se ha realizado el experimento. En el presente trabajo, como la centrifugación tuvo lugar siempre a 20° C sólo fue preciso tener en cuenta los valores de viscosidad y densidad del agua y del disolvente empleado correspondientes a 20° C. En el caso del DNA nativo los valores utilizados condujeron a un coeficiente de corrección global o factor por el que había que multiplicar el coeficiente de sedimentación aparente de 1,038 (133). Para el DNA desnaturalizado los valores parciales empleados (134) proporcionaron un valor de 1,127 para el coeficiente de corrección global.

Por otra parte, este coeficiente corregido se ha calculado para una concentración determinada, y es sabido que la concentración influye sobre los valores del coeficiente de sedimentación (130) (132). Por tanto, si se quiere que $s_{20,w}^c$ se ajuste a las condiciones de una disolución en la que la concentración en DNA fuera nula hay que proceder a determinar los coeficientes de sedimentación correspondientes a distintas concentraciones y extrapolar luego a concentración cero los valores obtenidos. La dependencia de la sedimentación respecto de la concentración se suele ajustar, en general, a la relación (127):

$$\frac{1}{s_{20,w}^c} = \frac{1}{s_{20,w}^o} \cdot (1 + k_s \cdot c) \quad (2.7)$$

en donde $s_{20,w}^c$ se refiere a los valores correspondientes a cada concentración, $s_{20,w}^0$ es el valor que se busca, correspondiente a concentración cero, c es la concentración y k_s es una constante que depende del soluto, de su masa molecular, de su heterogeneidad, del disolvente y de la temperatura (135).

Como resulta evidente en este caso, la representación gráfica de los valores $\frac{1}{s_{20,w}^c}$ frente a c da lugar a una recta, correspondiendo el valor de $s_{20,w}^0$ al inverso de la ordenada en el origen.

En el presente trabajo se efectuó esta extrapolación a concentración cero en la caracterización inicial del DNA, tanto en su estado nativo como desnaturalizado (véase 3.1.1.1. y 3.1.1.2.).

No obstante, y como se justificará con más detalle al comentar los resultados (véase 3.2.1.) en los experimentos posteriores se prescindió de esta extrapolación, realizándose la centrifugación a una concentración fija, que fue de 25 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del DNA nativo y de 20 $\mu\text{g/ml}$ en el del desnaturalizado.

Por otra parte, y por tratarse siempre de disoluciones acuosas, no se tuvo en cuenta ningún tipo de corrección referente a efectos de compresibilidad producidos por la velocidad (130) (132).

El efecto de dilución radial debido a la forma sectorial de la célula, aunque fue tenido en cuenta en el estudio de distribuciones (véase 2.4.1.3.), no mostró ninguna influencia sobre el coeficiente de sedimentación medio (véase 3.1.1.), por lo que tampoco fue necesario hacer correcciones de este tipo.

2.4.1.3. Cálculo de distribuciones y promedios de masa molecular

Una vez calculado el $s_{20,w}^c$, se procedió, para cada célula, al estudio detallado del perfil de sedimentación, con objeto de determinar la distribución integral de coeficientes de sedimentación correspondiente a esa concentración.

La razón de este estudio (véase 1.3.2.2.) estriba en que todas las muestras de DNA del presente trabajo, incluido los controles no irradiados, presentaban heterogeneidad desde el punto de vista de la masa molecular.

Los distintos tamaños moleculares, al sedimentar a velocidades diferentes, dan lugar a un ensanchamiento del frente de sedimentación, y, por consiguiente, al gradiente de concentración característico. Por esta razón, el estudio de la evolución con el tiempo de este perfil, en función de las concentraciones relativas permite establecer una distribución integral de coeficientes de sedimentación, y a partir de ésta la correspondiente distribución de masas moleculares.

Existen varias maneras de efectuar en la práctica estudios de distribuciones (136) (137). En el presente trabajo se escogió el método de Reitner (138) (139) debido a que conjuga sencillez y rigor teórico.

De acuerdo con este método, se elige en primer lugar un registro cualquiera de la célula, correspondiente a un tiempo suficientemente alto como para que se hayan separado de la zona de menisco las masas moleculares más pequeñas, y sobre su perfil se elige arbitrariamente

mente un número suficiente de puntos (fig. 15). En el presente trabajo este registro correspondió en general al último de los realizados para cada célula, registro que se am-

pliaba de tamaño (véase 2.4.1.1.)

y sobre el que se determinaba un número de puntos superior a doce.

Por otro lado, se cuidó siempre que estos puntos fueran más abundantes en las zonas correspon-

dientes a la "cabeza" y "cola" las que proporcionan mayor dificultad de lectura (140) (34).



Fig. 15.- Registro típico para el estudio de distribuciones

A continuación, y al igual que se hizo en el caso del coeficiente de sedimentación respecto del punto medio (véase 2.4.1.2.) se mide aquí, para cada uno de los puntos elegidos su distancia D_i respecto de la línea de referencia interna, LRI, de la célula. De una manera análoga, a cada uno de esos puntos se le mide asimismo su correspondiente altura, H_i , respecto de la línea base B. En la práctica aquí también resultó más fácil efectuar estas medidas respecto de referencias arbitrarias que coincidieran con líneas del papel milimetrado del registro, introduciéndose posteriormente las correcciones oportunas en los programas de cálculo (véase 2.5.2.).

Los valores correspondientes a las distancias sobre el papel de los puntos de la curva, D_i , así como los correspondientes al menisco, D_m , y al punto medio del perfil, D_{50} , se transforman entonces en

las distancias radiales r_i , r_m y r_{50} , de modo análogo al indicado en 2.4.1.2.

Los datos correspondientes a la altura de cada punto, H_i , se transforman, por su parte, en términos de porcentaje de concentración, c_i , dividiéndolos por el valor de la altura que presenta la meseta en el primer registro, H^o , valor que prácticamente no ha variado respecto del momento inicial de la sedimentación:

$$c_i = \frac{H_i}{H^o} \cdot 100 \quad (2.8)$$

Estos valores de c_i , a su vez, hay que corregirlos, debido al efecto de dilución radial producido por la forma sectorial de la célula (141) (132). La relación que expresa esta variación de concentración viene dada por:

$$\frac{c_i}{c_i^o} = \left(\frac{r_m}{r_i} \right)^2 \quad (2.9)$$

en donde además de los términos ya conocidos, aparece el valor que se busca, c_i^o , relativo a la concentración que le correspondería al punto que se estudia en el momento inicial de la sedimentación o "condiciones de menisco".

$$c_i^o = c_i \left(\frac{r_i}{r_m} \right)^2 = \frac{H_i}{H^o} \cdot 100 \cdot \left(\frac{r_i}{r_m} \right)^2 \quad (2.10)$$

El paso siguiente, relativo a la determinación de los coeficientes de sedimentación que corresponden a cada uno de esos puntos, se continúa

sigue mediante la aplicación de la siguiente expresión, deducida teóricamente por Reitner (138):

$$s_{i,20,w}^c = s_{50,20,w}^c \left[1 + \frac{\log (r_i / r_{50})}{\log (r_{50} / r_m)} \right] \quad (2.11)$$

pudiéndose apreciar la inclusión en esta fórmula del término $s_{50,20,w}^c$, que como se sabe, corresponde al coeficiente de sedimentación medio, calculado previamente y de forma independiente en el mismo experimento.

Ahora bien, estos valores de coeficientes de sedimentación se refieren a los puntos que arbitrariamente se han elegido sobre la curva, y, sin embargo, lo que realmente interesa es hallar los coeficientes de sedimentación que correspondan a un determinado número de fracciones iguales que, según un criterio dado, se elijan sobre la curva.

Con este fin se consideró a los perfiles de sedimentación divididos en 10 fracciones iguales entre la línea base y la meseta (fig. 15) desechándose las zonas por debajo del punto correspondiente al 5% y por encima del correspondiente al 95%, debido a su dificultad de lectura (128). Quedan de esta forma 9 fracciones iguales entre los puntos 5% y 15%, 15% y 25%,, 85% y 95%, para cada una de las cuales, se halló, por interpolación, el coeficiente de sedimentación $s_{i,20,w}^c$ correspondiente a su punto medio, es decir, se obtienen los coeficientes de sedimentación correspondientes a los puntos de concentración: 10%, 20%, 30%,, 90%. La interpolación de estos valores se realizó matemáticamente aplicando el método de Lagrange a los coeficientes de sedimentación corres

pondientes a los 4 puntos más próximos en el entorno del punto a interpolar.

De esta manera queda ya determinada la distribución integral de coeficientes de sedimentación para esa concentración.

Ahora bien, teniendo en cuenta el efecto de concentración sobre el coeficiente de sedimentación (véase 2.4.1.2.) hay que proceder, en rigor, a extrapolar a concentración cero los valores correspondientes a cada fracción, lo que implica realizar los mismos cálculos para concentraciones distintas (140) (128).

En el presente trabajo, al igual que se hizo con el coeficiente de sedimentación medio, se efectuó esta extrapolación en los experimentos iniciales de caracterización del DNA, (véase 3.1.2.1. y 3.1.2.2), realizándose medidas de sedimentación a diferentes concentraciones. Sin embargo, y remitiendo de nuevo la justificación a los resultados obtenidos (véase 3.2.1.), en los experimentos posteriores se prescindió de esta extrapolación, correspondiendo las distribuciones a las concentraciones fijas establecidas de 25 μ g/ml para el DNA nativo y 20 μ g/ml para el desnaturalizado.

Existen varias correlaciones de tipo semiempírico para transformar los valores de coeficientes de sedimentación en valores de masas moleculares, tanto para DNA nativo (120) (142) como desnaturalizado (33) (143) (144) (134). En el presente trabajo, para DNA nativo se utilizó la expresión de Crothers-Zimm (142):

$$0,445 \log M = 1,819 + \log (s_{20,w}^0 - 2,7) \quad (2.12)$$

mientras que para el DNA desnaturalizado se empleó la expresión de Mingot y otros (134):

$$s_{20,w}^0 = 0,059 \cdot M^{0,386} \quad (2.13)$$

Estas correlaciones, estrictamente, sólo son válidas para coeficientes de sedimentación extrapolados a concentración cero, pero por las razones ya aludidas, se utilizaron en el presente trabajo en las condiciones de concentración mencionadas. De igual modo, se siguieron empleando estas ecuaciones incluso en aquellos casos en que el modificador de la radiosensibilidad estudiado dió lugar a la formación de un complejo irreversible con el DNA (cromomicina A₃, antramicina, cis-DDP y, en parte, daunomicina), si bien en estos casos la comparación de la masa molecular se efectuó siempre, en el cálculo de rupturas, frente a controles del mismo complejo que hubieran sufrido idénticos procesos.

Una vez efectuadas las transformaciones anteriores de los s_i en M_i se puede hacer una representación gráfica de la distribución integral de masas moleculares. Por otra parte este virtual "fraccionamiento" permite calcular los promedios en peso, M_w , y en número, M_n , de la masa molecular (véase 1.3.2.2.) los cuales, como consecuencia del criterio establecido para la división en fracciones adoptaron la siguiente forma (128):

$$M_w = \frac{\sum M_i}{9} \quad M_n = \frac{9}{\sum 1/M_i} \quad (2.14)$$

Del mismo modo, se calculó también la relación M_w/M_n correspondiente al grado de heterogeneidad de tamaños moleculares.

2.4.1.4. Cálculo de rupturas de cadena y enlaces cruzados.

La comparación entre los M_w y M_n correspondientes a un DNA irradiado y los M_{w_0} y M_{n_0} de un control no irradiado del mismo DNA, de terminados de la forma que se acaba de explicar, permite el cálculo de las rupturas de cadena (o, en su caso, enlaces cruzados) que se producen por efecto de la radiación.

En el presente trabajo, la frecuencia de rupturas se calculó utilizando las dos fórmulas que se han visto en la parte teórica (véase 1.3.2.2.) y que de nuevo se transcriben aquí. La más rigurosa de Charlesby (ecuación 1.18):

$$B = \frac{2m}{3} \left(\frac{2}{M_n} - \frac{1}{M_w} - \frac{2}{M_{n_0}} + \frac{1}{M_{w_0}} \right)$$

y la que únicamente considera los promedios en número de la masa molecular (ecuación 1.19):

$$B = m \left(\frac{1}{M_n} - \frac{1}{M_{n_0}} \right)$$

En ambas fórmulas B expresa la frecuencia de rupturas referida al monómero, por lo que, en caso de tratarse de DNA nativo, el valor que se obtiene, y que se representa por B_2 , corresponde a rupturas

dobles/nucleótido par, mientras que en el caso de DNA desnaturalizado el valor obtenido, B_1 , corresponderá a rupturas simples/nucleótido.

El término m en las ecuaciones anteriores hace referencia a la masa molecular del monómero, por lo que es evidente que tratándose de DNA este valor ha de ser necesariamente un valor promedio. En el presente trabajo se adoptó como masa molecular del nucleótido promedio de DNA de timo de ternera un valor de 310 Dalton (124), siendo por tanto 620 Dalton el valor de m aplicado al caso de rupturas dobles.

Además de como frecuencia de rupturas por nucleótido, los programas de cálculo proporcionaron simultáneamente los valores de las rupturas en términos de rupturas/molécula y de rupturas/ 10^6 Dalton (véase apéndices 1, 2 y 3), expresiones encontradas a veces en otros trabajos sobre DNA irradiado (145).

De modo similar, en los casos en que se calcularon frecuencias de enlaces cruzados, éstas se determinaron mediante la ecuación de Charlesby (ecuación 1.26):

$$C = \frac{2m}{3} \left(\frac{1}{M_n} - \frac{2}{M_w} + \frac{2}{M_{w_0}} - \frac{1}{M_{n_0}} \right)$$

2.4.2. Espectrofotometría

Las medidas espectrofotométricas de tipo cuantitativo se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Beckman, Modelo DU, de un solo haz

en cubetas de cuarzo emparejadas de 1 cm de paso de luz, tomando como referencia el disolvente empleado en cada caso.

La determinación de la concentración del DNA se realizó leyendo la absorbancia de la muestra en el U.V. a 260 nm (máximo de absorción del DNA). En estas condiciones se tuvo en cuenta que a 1 U.D.O. le corresponde una concentración de DNA de timo de ternera de $47,8 \mu\text{g/ml}$, lo que en términos de "concentración total de nucleótidos" supone un coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 6.500$ (11).

En los casos en que se estudiaron las variaciones espectrales producidas como consecuencia de la formación de complejos, efectos de diálisis, o irradiación, se efectuaron barridos a diferentes longitudes de onda en un espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer Modelo 200, de doble haz y con registro incorporado. En esta ocasión también las lecturas se realizaron en cubetas de cuarzo emparejadas de 1 cm de paso de luz, tomándose como referencia el disolvente empleado en cada caso. La concentración de las muestras en el momento de la lectura estuvo condicionada a las características de absorbancia de cada modificador. Así, en aquellos casos en que se estudiaron las alteraciones producidas en las zonas del U.V. próximas al máximo del DNA, la concentración fue la de centrifugación, es decir, aproximadamente $25 \mu\text{g/ml}$ en DNA. Por el contrario, cuando la muestra presentaba absorbancia en el visible, fue preferible efectuar las lecturas a la concentración de $200 \mu\text{g/ml}$, propia del momento de la irradiación. Hubo ocasiones, no obstante, en las que sobre un mismo registro se efectuaron lecturas a concentraciones distintas, como por ejemplo en el caso de la comparación entre los espectros del DNA y de un modificador.

2.5. PROGRAMAS DE CALCULO

Con objeto de realizar todas las operaciones matemáticas descritas en 2.4.1.2., 2.4.1.3. y 2.4.1.4., se elaboraron tres programas de cálculo. La ejecución de estos programas, escritos en lenguaje "BASIC", tuvo lugar en una calculadora Hewlett-Packard, Modelo 9830A, con impresor 9866 A incorporado.

Aunque los listados de dichos programas aparecen completos en los apéndices 1, 2 y 3, solamente se hará a grandes rasgos su descripción, dada la magnitud y complejidad de los mismos. No obstante, se explicará detalladamente, para cada uno de ellos, el proceso de introducción de datos.

2.5.1. Programa para el cálculo de coeficientes de sedimentación

Por medio de este programa (véase apéndice 1), se lleva a cabo fundamentalmente, la determinación del coeficiente de sedimentación, según los cálculos descritos en 2.4.1.2.

Las primeras líneas del programa, entre la 10 y la 350, corresponden principalmente a la introducción de datos. Entre las líneas 360 y 890 el programa elabora estos datos, calcula por regresión lineal la pendiente de la recta (ecuación 2.4) y determina el coeficiente de sedimentación medio en condiciones estandarizadas.

En la línea 70 está prevista la posibilidad de efectuar la extrapolación a concentración cero para aquellos casos en que se disponga de

valores correspondientes a diferentes concentraciones, enviando los da :
tos al bloque de líneas que va de la 470 a la 580. En estos casos, y so-
bre el valor extrapolado que finalmente se obtiene, se efectúa, a partir
de la línea 900, una estimación de la masa molecular suponiendo que
 $M_w/M_n = 2$, así como se da cabida a la posibilidad de efectuar cálculos
de rupturas y enlaces cruzados para aquellos casos en que el correspon-
diente DNA se quiera comparar con otro, considerado como control.

A continuación se detalla la forma en que se introducen los da
tos, teniendo presente todo lo indicado en 2.4.1.2.:

APARECE EN PANTALLA

"EXPERIMENTO NUMERO ?"

"NATIVO SI = Ø ?"

"NUMERO CONCENTRACIONES ?"

"FACTOR CORRECCION 2 Ø H2O ?"

DATO A INTRODUCIR

Número de referencia del ex
perimento . (No afecta a los cál
culos.

En caso de DNA nativo, pul-
sar la tecla Ø ; en caso de desna-
turalizado, cualquier otra.

Número de experimentos que
se han efectuado a distinta con-
centración, para un mismo DNA,
con objeto de extrapolar a concen-
tración cero (Número máximo, 6).

Factor de corrección global
por el que hay que multiplicar los
coeficientes de sedimentación apa
rentes para obtener los correspon-
dientes a condiciones estandariza-
das.

APARECE EN PANTALLA

DATO A INTRODUCIR

"VELOCIDAD EN RPM ?"

Velocidad de centrifugación en revoluciones por minuto.

"CELULA NUMERO ?"

Número de referencia de la célula en el rotor . (No afecta a los cálculos).

"CONCENTRACION... ?"

Concentración del DNA, en $\mu\text{g/ml}$, en la célula.

"NUMERO DATOS CONC... ?"

Número total de registros leídos para una célula. (Número máximo, 12).

"REFERENCIA INTERNA... ?"

Distancia en cm desde la referencia arbitraria determinada sobre el papel hasta la línea de referencia interna de la célula.

"REFERENCIA EXTERNA... ?"

Idem a la línea de referencia externa de la célula.

"DISTANCIA... ?"

Idem al punto medio del frente de sedimentación.

"TIEMPO... ?"

Tiempo, en min, correspondiente a esa lectura.

(cuando ha habido extrapolación)

"MW CONTROL ?"

Masa molecular promedio en peso del DNA considerado como control,

APARECE EN PANTALLA

DATO A INTRODUCIR

con objeto de estimar rupturas y enlaces cruzados a partir de los datos anteriores.

"MN CONTROL ?"

Idem, aunque promedio en número.

2.5.2. Programa para el cálculo de distribuciones, promedios de masa molecular, rupturas y enlaces cruzados

El segundo programa (véase apéndice 2), sirve para el cálculo de distribuciones de coeficientes de sedimentación y de masas moleculares, promedios de masa molecular, grado de heterogeneidad, rupturas y enlaces cruzados de cadenas, conforme a lo visto en 2.4.1.3. y 2.4.1.4.

Al igual que en el programa anterior aquí también existe una primera parte, de la línea 10 a la 740, destinada fundamentalmente al almacenamiento de datos.

De la línea 750 a la 910 se elaboran esos datos, pasando sucesivamente de D_i a r_i y a $s_{i,20,w}$ y de H_i a c_i^0 . Entre las líneas 1000 y 1410 se interpolan los valores $s_{i,20,w}^c$, correspondientes a las fracciones en que se ha dividido la curva, calculando simultáneamente las masas moleculares correspondientes a cada uno de esos coeficientes de sedimentación interpolados.

De la misma forma que en el programa anterior, en la línea 120 está prevista la posibilidad de hacer una extrapolación a concentración cero

para cada una de estas fracciones, en el caso de que se posean los datos correspondientes a concentraciones distintas, enviando los valores al bloque de líneas comprendido entre la 1650 y la 1950.

En todo caso, los valores de las masas moleculares de las fracciones que forman una distribución se elaboran, entre las líneas 2010 y 2030, para dar las M_w , M_n y el grado de heterogeneidad.

Finalmente, a partir de la línea 2120, y tras pedir los promedios de masa molecular correspondientes al DNA considerado como control, el programa calcula, tanto a partir de la ecuación (1.18) como a partir de la ecuación (1.19), los valores de rupturas y enlaces cruzados, valores que se expresan de distintas formas.

A continuación se detalla la manera en que se introducen los datos en el programa, teniendo presente todo lo que se explicó en 2.4.1.3. y 2.4.1.4.:

APARECE EN PANTALLA

DATO A INTRODUCIR

"EXPERIMENTO NÚMERO ?"

Número de referencia del experimento. (No afecta a los cálculos).

"NATIVO SI = Ø ?"

En caso de DNA nativo pulsar la tecla Ø; en caso de desnaturado, cualquier otra.

"NÚMERO DE CONCENTRACIONES?"

Número de distribuciones de un mismo DNA que se han estudiado a distintas concentraciones, con objeto de extrapolar a concentración cero. (Número máximo, 5).

APARECE EN PANTALLA

DATO A INTRODUCIR

"CORRECCION RADIAL SI = \emptyset ?"

En caso de que se desee hacer la corrección radial sobre la curva, pulsar la tecla \emptyset ; en caso contrario, cualquier otra.

"CELULA NUMERO... ?"

Número de referencia de la célula en el rotor. (No afecta a los cálculos).

"CONCENTRACION... ?"

Concentración del DNA en $\mu\text{g/ml}$, en la célula.

"FOTO NUMERO ?"

Número del registro elegido para efectuar la lectura de distribución en esa misma célula. (No afecta a los cálculos).

"NUMERO DATOS ?"

Número de puntos leídos sobre la curva. (Máximo, 18).

"REFERENCIA INTERNA ?"

Distancia en cm desde la referencia arbitraria para abscisas determinada sobre el papel a la línea de referencia interna de la célula.

"REFERENCIA EXTERNA ?"

Idem a la línea de referencia externa de la célula.

"PLATEAU INICIAL ?"

Distancia en cm desde la referencia arbitraria para ordenadas, determinada sobre el papel a la me

APARECE EN PANTALLA

DATO A INTRODUCIR

"LINEA BASE ?"

seta en el primer registro. En caso de que no se efectúe corrección radial, corresponderá a la meseta del registro que se lee.

Idem a la línea correspondiente a la absorbancia debida al disolvente.

"DISTANCIA PROMEDIO ?"

Distancia en cm desde la referencia arbitraria para abscisas, determinada sobre el papel al punto medio del frente de sedimentación. (Coincide con la determinada previamente, en el mismo experimento, para el cálculo del coeficiente de sedimentación medio).

"DISTANCIA MENISCO ?"

Idem a la línea correspondiente al menisco.

"S PROMEDIO ?"

Valor del coeficiente de sedimentación medio, en condiciones estandarizadas, calculado previamente para esa célula.

"ALTURA... ?"

Valor de la altura de cada punto, elegido sobre la curva en cm, desde la referencia arbitraria para ordenadas determinada sobre el papel

APARECE EN PANTALLA

DATO A INTRODUCIR

"DISTANCIA... ?"

Distancia en cm desde la referencia arbitraria para abscisas, determinada sobre el papel, a cada punto elegido sobre la curva.

"MW CONTROL ?"

Masa molecular promedio en peso del DNA considerado como control.

"MN CONTROL ?"

Idem, aunque promedio en número.

2.5.3. Programa auxiliar

Se elaboró también un programa de cálculo adicional para aquellos casos en que se tuvieron unos valores conocidos de coeficientes de sedimentación, correspondientes a las fracciones de la distribución integral. Esta situación se presentó principalmente cuando se realizó de forma manual la extrapolación de las distribuciones a condiciones de concentración cero y por tanto se deseaba proseguir los cálculos a partir de unos valores de $1/s_{i20}^0$, conocidos.

En realidad este programa no es más que una forma reducida del programa anterior, en el que la única variación digna de reseñar se produce en el momento de la introducción de datos, cuando en pantalla aparecen sucesivamente "1/S.... ?" en demanda de los valores ya mencionados.

Su listado aparece completo en el apéndice 3.

III. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACION DEL DNA

Se exponen a continuación los resultados de los experimentos de velocidad de sedimentación efectuados con objeto de caracterizar el DNA.

En estos experimentos se realizó el cálculo de coeficientes de sedimentación medios, $s_{20,w}$, y se estudió su dependencia respecto de la concentración. Asimismo se calcularon las distribuciones integrales de coeficientes de sedimentación en función de la concentración, se consideró la influencia del efecto de dilución radial y finalmente se calcularon las distribuciones integrales y los promedios en peso y en número de las masas moleculares.

3.1.1. Coeficientes de sedimentación

En la tabla II se muestra un ejemplo del cálculo del coeficiente de sedimentación para el caso de una de las concentraciones estudiadas en la caracterización del DNA. La representación gráfica que aparece en la fig. 16 corresponde a los mismos datos. Este ejemplo puede considerarse como representativo de todos los demás casos de determinación de coeficientes de sedimentación del presente trabajo, debido a que en todos ellos se realizó la representación gráfica anterior, comprobándose siempre un perfecto ajuste de los puntos a una recta. Este hecho confirma como correcta la suposición de que el coeficiente de sedimentación correspondiente al 50% del gradiente de concentración permanece constante durante la centrifugación (véase 2.4.1.2.) y, por tanto, la validez de la ecuación (2.4). De no haber sido así, como sucede en el caso de

TABLA II

EXPERIMENTO NUMERO 158

DNA NATIVO

VELOCIDAD: 20000 RPM COEF. CORREC. GLOBAL: 1.038

CELULA 4

CONCENTRACION: 19.36

	LRI	LRE	D	T	R	LH R
1	0.400	8.500	2.050	28.08	6.0259	1.7361
2	0.325	7.925	2.125	40.70	6.0789	1.8048
3	0.050	7.650	2.050	52.90	6.1211	1.8117
4	0.450	8.050	2.675	65.12	6.1584	1.8194
5	0.100	7.700	2.575	77.38	6.2211	1.8279
6	0.000	7.600	2.700	89.72	6.2684	1.8355
7	0.200	7.800	3.175	101.92	6.3263	1.8447
8	0.225	7.825	3.475	117.50	6.3842	1.8538
9	0.150	38.150	17.200	129.45	6.4179	1.8591

PENDIENTE
6.34026E-04

D. STANDARD
9.46436E-06

ORDENADA
1.778622735

D. STANDARD
8.01046E-04

CORRELACION 0.99922

COEF. SED. MEDIO 2.501E+01

INVERSO 3.999E-02

Ejemplo característico de cálculo de coeficiente de sedimentación medio para una concentración determinada.

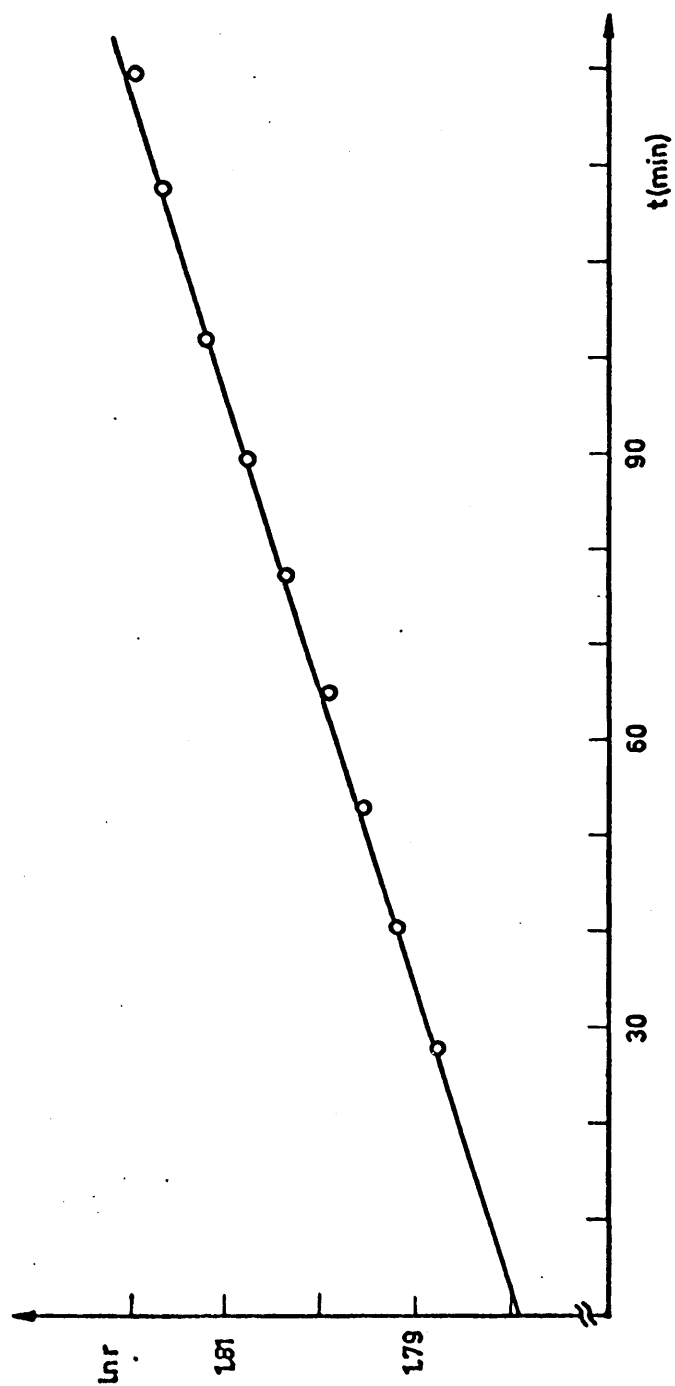


Figura 16.- Representación de distancias radiales (r) frente al tiempo (t) en el cálculo de coeficientes de sedimentación.

aquellas sustancias con fuerte dependencia entre s y c , la representación gráfica de $\ln r$ frente a t , a consecuencia del efecto de dilución radial a lo largo de la célula, no hubiera dado lugar a una recta, sino a una línea con pendiente creciente (133), cosa que nunca se observó.

3.1.1.1. DNA nativo

Los coeficientes de sedimentación en condiciones estandarizadas de disolvente y temperatura, $s_{20,w}^c$, correspondientes a las concentraciones estudiadas de DNA nativo se indican en la siguiente tabla III:

TABLA III

<u>c (μ g/ml)</u>	<u>$s_{20,w}^c$ (S)</u>
34	23,9
28	23,5
24	25,2
19	25,0
15	25,4

La extrapolación de estos valores a condiciones de concentración cero (fig. 17 a) condujo a un valor de:

$$s_{20,w}^o = 27,1 \text{ S}$$

obteniéndose de la pendiente de la recta, en este ajuste, un valor de

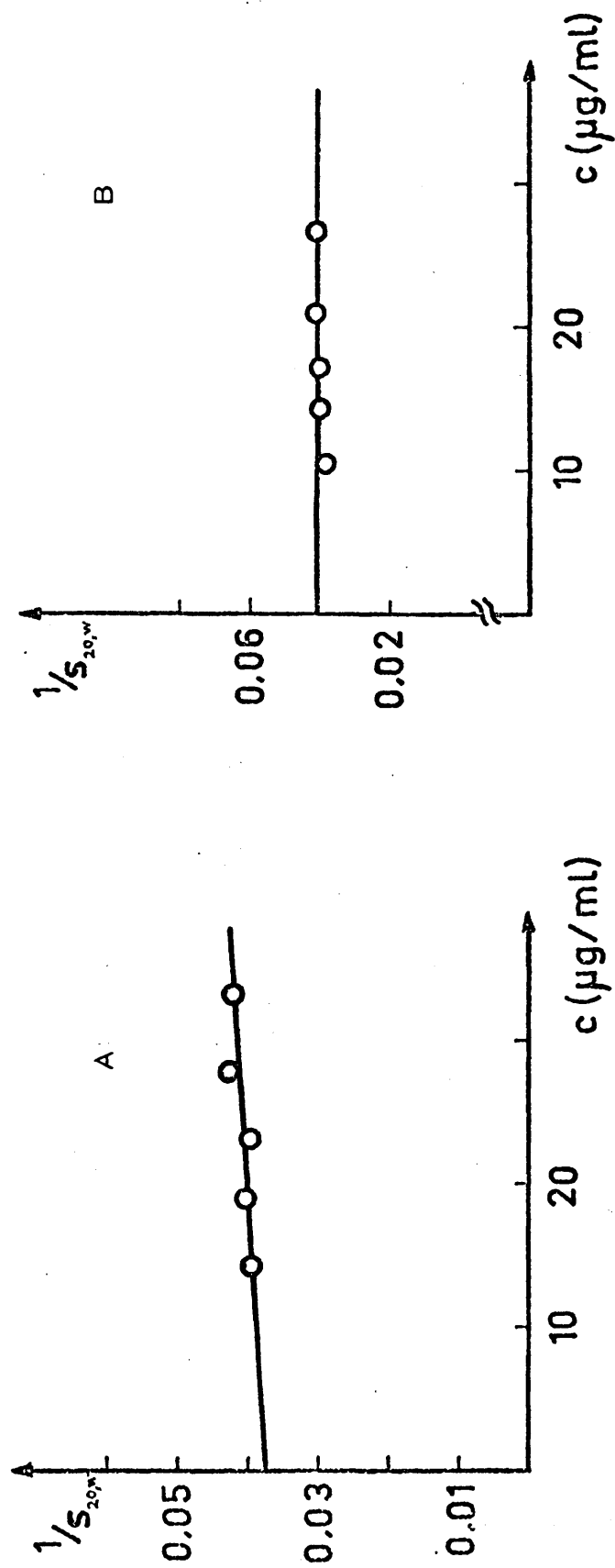


Figura 17.- Extrapolación a concentración cero de los coeficientes de sedimentación del DNA control: A) nativo; B) desnaturalizado.

$$k_s = 1,6 \text{ dl/g (ecuación 2.7).}$$

Comparando los valores anteriores con los encontrados en la bibliografía para DNA de timo de ternera en condiciones de trabajo similares, se desprende que, tanto los coeficientes de sedimentación como su dependencia con la concentración, entran dentro del rango obtenido por otros autores (120).

A continuación se efectuó una estimación de la masa molecular, aplicando directamente la correlación de Crothers-Zimm (ecuación 2.12) al valor de $s_{20,w}^0$. De esta forma se obtuvo un valor de $M = 16,1 \cdot 10^6$ Dalton, que corresponde a un promedio que resulta ser, en general, ligeramente inferior al promedio en peso M_w (133).

3.1.1.2. DNA desnaturalizado

Se procedió de idéntica manera con el DNA desnaturalizado, obteniendo los valores de coeficientes de sedimentación que se indican a continuación:

TABLA IV

<u>c (μ g/ml)</u>	<u>$s_{20,w}^c$ (S)</u>
27	19,7
21	19,6
17	19,8
14	19,7
11	20,1

Como puede apreciarse, en este caso no se observó variación significativa del coeficiente de sedimentación en el rango de concentraciones estudiado, hecho que se encuentra de acuerdo con la información bibliográfica (144) (120) (34). Por este motivo se consideró nula la pendiente de la recta de extrapolación (fig. 17 b) y, en consecuencia, también el valor de k_s (ecuación 2.7), adoptándose como $s_{20,w}^0$ el promedio de los valores de coeficiente de sedimentación anteriores:

$$s_{20,w}^0 = 19,8 \text{ S}$$

Al igual que en el caso del DNA nativo, aunque aplicando en este caso la ecuación (2.13), se estimó una masa molecular de $M = 3,49 \cdot 10^6$ Dalton. El bajo valor de esta masa molecular, comparado con el del DNA nativo, indica la existencia de rupturas simples en las cadenas del DNA.

3.1.2. Distribuciones y masas moleculares

En los experimentos anteriores, además de los cálculos de coeficientes de sedimentación correspondientes al 50% de concentración del gradiente, se realizaron estudios de distribuciones integrales de coeficientes de sedimentación y masas moleculares, tanto para DNA nativo como para DNA desnaturalizado.

En la tabla V se presentan, como ejemplo representativo, los datos que incluye el cálculo de distribuciones a una concentración dada, correspondientes, también en este caso, al ejemplo mostrado al hablar del coeficiente de sedimentación medio.

TABLA V

ENFRIAMIENTO 153

LA NATIVO

CELULA 4

CONCENTRACION 19.36

FOTO NUM. 9

LRI 0.150

NUM. DATOS 14

LPE 38.150

PLATEAU INITIAL 2.200
 LINEA BASE 0.400
 DIST. PROMEDIO 17.100
 DIST. MENISCO 6.050
 S PROMEDIO 25.010

H	D
0.400	9.600
0.450	10.400
0.500	11.200
0.600	12.100
0.700	13.000
0.800	14.200
1.000	16.000
1.150	17.200
1.300	18.900
1.500	21.000
1.600	22.400
1.700	23.800
1.850	26.400
1.900	27.700

.....
 VALORES INTERPOLADOS:

C/CT	1/S	S	M
10	0.0754	13.26	2.430E+06
20	0.0602	16.46	4.410E+06
30	0.0496	20.16	7.532E+06
40	0.0438	22.85	1.040E+07
50	0.0393	25.48	1.369E+07
60	0.0347	28.81	1.860E+07
70	0.0316	31.68	2.351E+07
80	0.0286	34.98	2.997E+07
90	0.0260	39.44	3.766E+07

MASES MOLECULARES:

M1 = 2.203E+06

M2 = 1.647E+07

M3 M4 = 1.006E+09

Ejemplo característico del cálculo de distribuciones de coeficientes de sedimentación para una concentración determinada.

3.1.2.1. DNA nativo

Se determinaron las distribuciones de coeficientes de sedimentación para las distintas concentraciones de DNA nativo, y los valores obtenidos para cada fracción, $s_{i20,w}^c$, se extrapolaron a condiciones de concentración cero.

Al mismo tiempo, se determinaron las ks_i de las fracciones (ecuación (2.7)) a partir de las pendientes de las rectas de extrapolación (fig. 18), con objeto de evaluar el grado de influencia de la concentración en la sedimentación de cada una de las fracciones.

Finalmente, a partir de los coeficientes de sedimentación extrapolados a condiciones de concentración cero, $s_{i20,w}^o$, se calcularon las masas moleculares de cada fracción, M_i^o , y a partir de éstas, el promedio en peso, M_w y el promedio en número, M_n , de las masas moleculares de la distribución, así como el grado de heterogeneidad, M_w/M_n .

En la tabla VI aparecen detallados los resultados obtenidos.

En relación con ellos cabe comentar, en primer lugar, la influencia normal que ejerce la concentración sobre los coeficientes de sedimentación de las fracciones. Los valores de $s_{i20,w}^c$, en las fracciones equivalentes, aumentan conforme se hace menor la concentración del experimento. Esta dependencia, a su vez, es más acusada cuanto mayor es el valor de $s_{i20,w}^c$, es decir, en las fracciones correspondientes a masas moleculares más altas.

Por otra parte, y en relación con las masas moleculares ob-

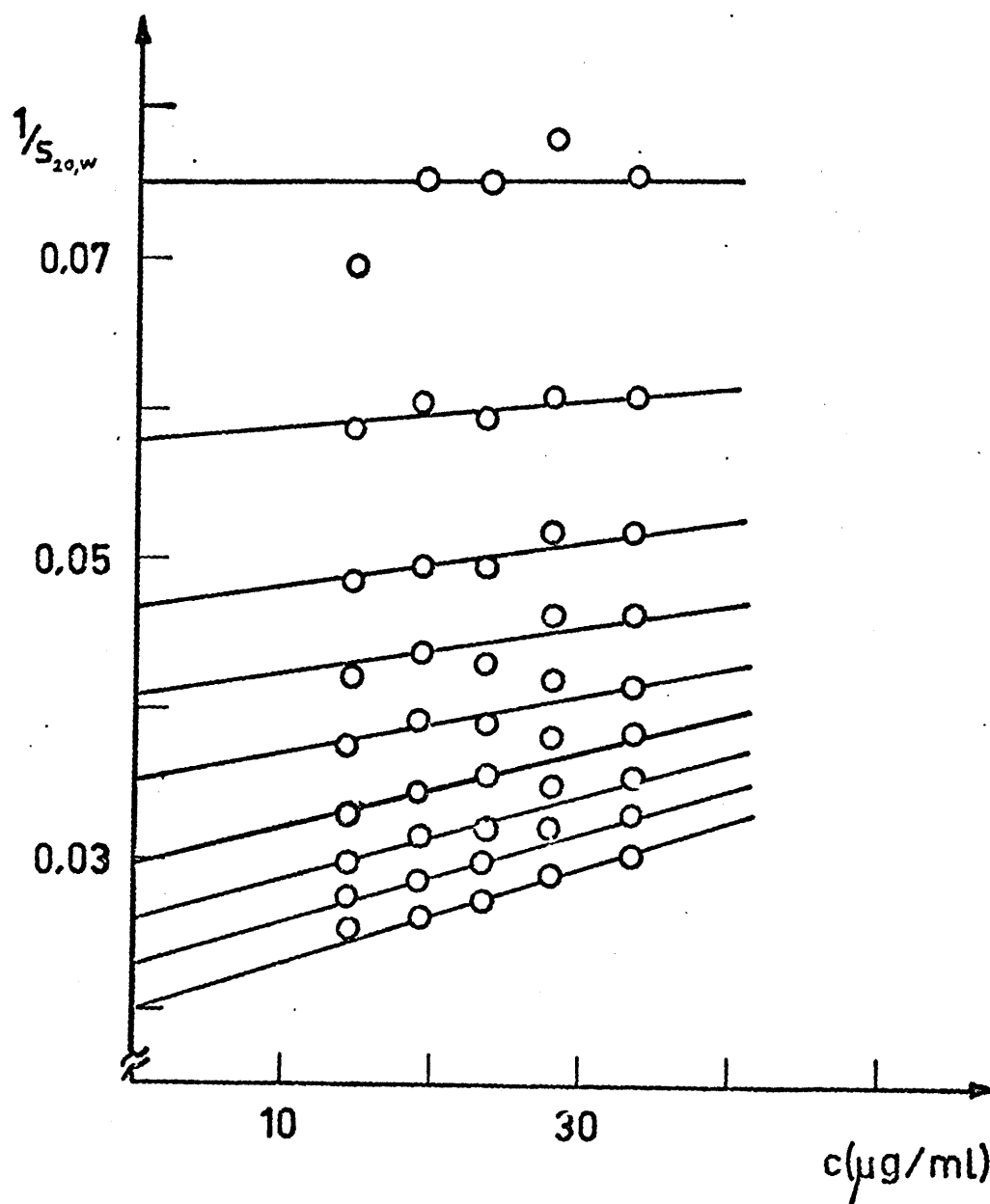


Figura 18.- Extrapolación a concentración cero de los coeficientes de sedimentación correspondientes a las fracciones (fi) de distribución del DNA nativo.

TABLA VI

Caracterización del DNA nativo aplicando corrección radial

f_i (%)	$s_{i20,w}^c$ (S)					$s_{i20,w}^o$ (S)	ks_i (dl/g)	Mi ($\times 10^6$)
	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5			
10	13,2	12,8	13,3	13,3	14,4	13,3	0,14	2,47
20	16,4	16,4	16,8	16,5	17,0	17,2	0,94	4,99
30	19,3	19,2	20,1	20,2	20,6	21,5	1,4	8,90
40	21,6	21,6	23,2	22,8	23,7	24,4	1,6	12,3
50	24,0	23,8	25,5	25,5	26,6	28,6	2,0	18,2
60	26,0	26,1	28,1	28,8	30,3	23,3	2,5	26,6
70	28,1	28,5	31,0	31,7	33,6	38,5	2,9	37,7
80	30,2	31,1	33,6	35,0	36,5	43,5	3,0	50,7
90	32,9	34,3	36,5	38,4	39,0	50,0	3,1	70,7

$Mw = 25,8 \cdot 10^6$ Dalton

$Mn = 9,46 \cdot 10^6$ Dalton

$Mw/Mn = 2,7$

(f_i , fracción de distribución; $s_{i20,w}^c$, coeficiente de sedimentación para las distintas concentraciones: $c_1 = 34 \mu\text{g/ml}$, $c_2 = 28 \mu\text{g/ml}$, $c_3 = 24 \mu\text{g/ml}$, $c_4 = 19 \mu\text{g/ml}$, $c_5 = 15 \mu\text{g/ml}$; $s_{i20,w}^o$, coeficiente de sedimentación extrapolado a concentración cero; ks_i , pendiente de la recta de extrapolación; Mi , masa molecular; Mw , masa molecular promedio en peso; Mn , masa molecular promedio en número; Mw/Mn , grado de heterogeneidad).

tenidas, se puede observar que la masa molecular correspondiente al 50% de concentración del gradiente no varía significativamente según se calcule a partir del coeficiente de sedimentación medio, $s_{20,w}^0$, (véase 3.1.1.1.) o a partir del valor proporcionado por la fracción 50% en las distribuciones de coeficientes de sedimentación extrapoladas a concentración cero, hecho que confirma la escasa repercusión del efecto de dilución radial sobre el valor del coeficiente de sedimentación en ese punto (véase 3.1.1.). Sin embargo, el valor que finalmente se obtiene a partir de la distribución de masas moleculares para el promedio en peso, M_w , difiere considerablemente de la estimación previa efectuada a partir del $s_{20,w}^0$. Se puede atribuir esta discrepancia al hecho de que, independientemente de existir una gran heterogeneidad, no se cumple la condición de ser distribuciones simétricas de masas moleculares (133), influyendo decisivamente en este caso el mayor porcentaje de masas moleculares elevadas en el aumento observado del M_w .

Con objeto de ver la influencia del efecto de dilución radial, en la tabla VII aparecen los resultados correspondientes a los mismos cálculos que los de la tabla VI, si bien eliminando la corrección correspondiente a este efecto. Comparando ambas tablas, se puede comprobar que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en uno u otro caso. Este hecho justifica que se prescindiera de este paso en aquellas ocasiones excepcionales en las que, por dificultades en el registro gráfico, fue imposible determinar con exactitud la meseta inicial. No obstante, esta corrección fue efectuada como norma general.

Hay que señalar aquí también que, antes de efectuar las extra-

TABLA VII

Caracterización del DNA nativo prescindiendo de corrección radial

f _i (%)	s _{i20,w} ^c (S)					s _{i20,w} ^o (S)	ks _i (dl/g)	Mi(x10 ⁶)
	c ₁	c ₂	c ₃	c ₄	c ₅			
10	13,0	12,5	12,9	13,0	13,8	13,3	0,05	2,47
20	16,0	16,0	16,4	15,8	16,4	16,7	0,62	4,56
30	19,0	18,8	19,6	19,6	19,5	20,2	1,0	7,57
40	21,4	21,2	22,8	22,4	22,9	23,8	1,4	11,54
50	23,9	23,5	25,3	25,0	25,5	27,4	1,7	16,42
60	26,1	26,0	28,0	28,7	29,3	32,3	2,1	24,58
70	28,4	28,6	31,4	31,9	33,0	37,7	2,5	36,02
80	30,8	31,8	34,3	36,1	36,4	44,4	2,9	53,4
90	34,6	36,2	37,4	40,5	39,5	52,6	3,1	79,8

Mw = 26,3.10⁶ Dalton

Mn = 8,97.10⁶ Dalton

Mw/Mn = 2,9

(f_i, fracción de distribución; s_{i20,w}^c, coeficiente de sedimentación para las distintas concentraciones: c₁ = 34 µg/ml, c₂ = 28 µg/ml, c₃ = 24 µg/ml, c₄ = 19 µg/ml, c₅ = 15 µg/ml; s_{i20,w}^o, coeficiente de sedimentación extrapolado a concentración cero; ks_i, pendiente de la recta de extrapolación; Mi, masa molecular; Mw, masa molecular promedio en peso; Mn, masa molecular promedio en número; Mw/Mn, grado de heterogeneidad).

polaciones a concentración cero de los coeficientes de sedimentación de las fracciones, el programa de cálculo proporcionaba simultáneamente para cada fracción un valor de masa molecular, M_i^C , determinado por aplicación directa de la ecuación de Crothers-Zimm (ecuación 2.12) a los coeficientes de sedimentación, $s_{i20,w}^C$, obtenidos a esa concentración (véase tabla VI). En la tabla VIII aparecen estos valores de M_i^C , así como los que se obtienen efectuando su extrapolación gráfica directa a condiciones de concentración cero (fig. 19). Los resultados revelan que los valores así obtenidos no difieren apreciablemente de los M_i^O calculados a partir de los coeficientes de sedimentación extrapolados a concentración cero, $s_{i20,w}^O$, excepto para las fracciones de masa molecular más elevada. También se observa, al igual que en aquel caso, una influencia de la concentración que resulta ser más acusada para las masas moleculares más altas.

3.1.2.2. DNA desnaturalizado

De manera muy similar se procedió con el DNA desnaturalizado, obteniéndose los datos que figuran en la tabla IX. En este caso, sin embargo, y debido a que no se observaron efectos apreciables de concentración sobre los valores de coeficiente de sedimentación de las fracciones, se consideró como $s_{i20,w}^O$ el promedio de las $s_{i20,w}^C$ de cada fracción. A los valores de $s_{i20,w}^O$ se les aplicó la ecuación (2.13), obteniéndose unos valores de masas moleculares correspondientes a cada fracción, M_i^O , los cuales sirvieron de base para el cálculo de los promedios M_w , M_n y el grado de heterogeneidad, M_w/M_n de la distribución.

Comparando estos resultados con los del DNA nativo se obser-

TABLA VIII

Masas moleculares de DNA nativo calculadas con corrección radial

f_i (%)	$M_i^C (\times 10^6)$					$M_i^O (\times 10^6)$
	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5	
10	2,42	2,20	2,46	2,43	3,04	3,25
20	4,33	4,38	4,66	4,41	4,84	5,07
30	6,72	6,64	7,49	7,53	8,01	9,05
40	9,02	8,96	10,8	10,4	11,4	13,3
50	11,8	11,5	13,8	13,7	15,3	17,8
60	14,5	14,5	17,4	18,6	21,0	26,0
70	17,5	18,1	22,4	23,6	27,1	34,3
80	21,0	22,6	27,1	30,0	33,2	43,0
90	25,8	28,7	33,3	37,7	39,0	51,0
<hr/>						
	Mw = 12,6	Mw = 13,1	Mw = 15,5	Mw = 16,5	Mw = 18,1	Mw = 22,5
	Mn = 7,49	Mn = 7,29	Mn = 8,26	Mn = 8,21	Mn = 9,44	Mn = 10,5

(f_i , fracción de distribución; M_i^C , masa molecular calculada a las distintas concentraciones: $c_1 = 34 \mu\text{g/ml}$, $c_2 = 28 \mu\text{g/ml}$, $c_3 = 24 \mu\text{g/ml}$, $c_4 = 19 \mu\text{g/ml}$, $c_5 = 15 \mu\text{g/ml}$; M_i^O , masa molecular extrapolada a concentración cero; Mw, masa molecular promedio en peso; Mn, masa molecular promedio en número).

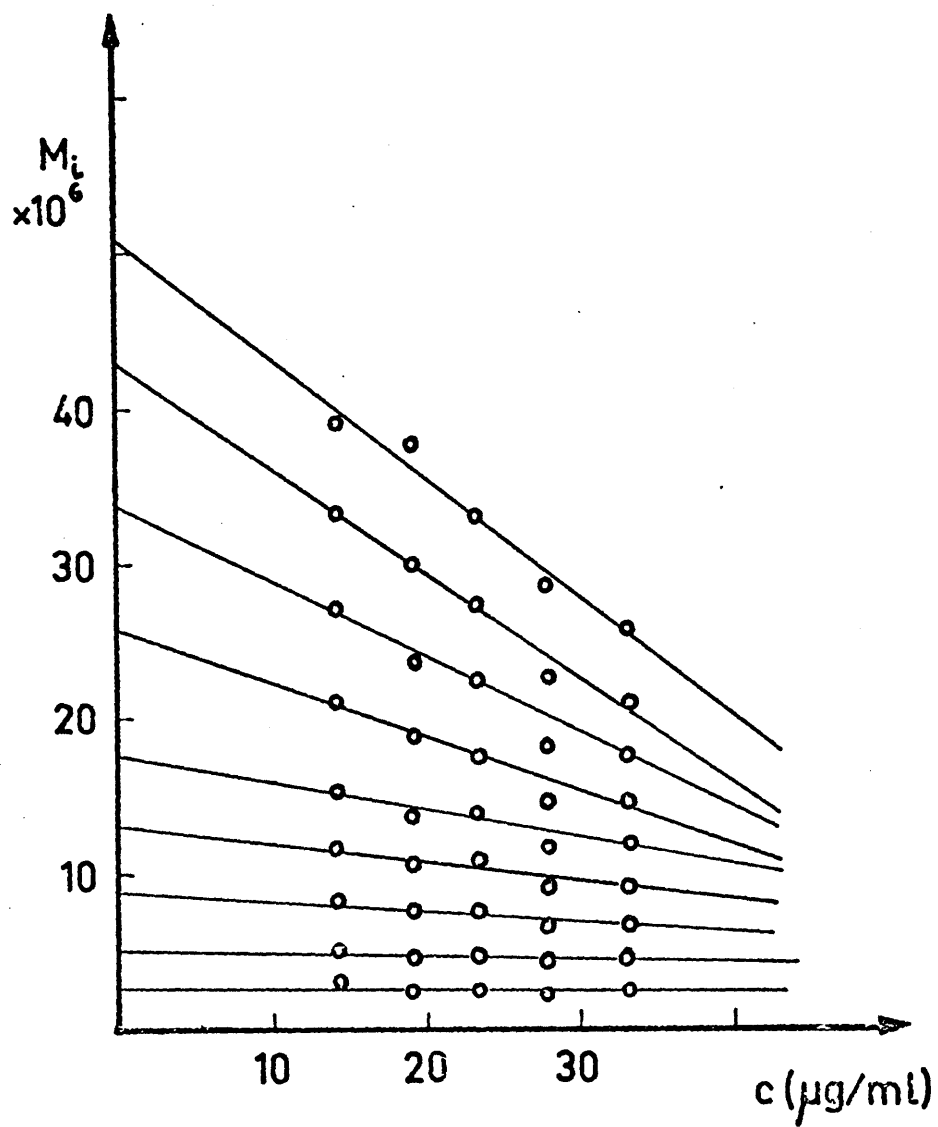


Figura 19.- Extrapolación a concentración cero de distribuciones de masas moleculares del DNA nativo calculadas a cada concentración.

TABLA IX

Caracterización del DNA desnaturalizado aplicando corrección radial

f_i (%)	$s_{i20,w}^c$ (S)					$s_{i20,w}^0$ (S)	Mi($\times 10^6$)
	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5		
10	10,3	10,2	10,3	10,3	10,9	10,4	0,66
20	13,9	12,6	12,8	12,8	13,6	13,1	1,20
30	15,0	14,8	15,4	15,0	16,2	15,3	1,79
40	17,2	16,8	17,5	17,3	18,3	17,4	2,50
50	19,2	18,9	19,3	19,4	19,9	19,3	3,27
60	21,4	20,9	21,1	21,6	21,3	21,3	4,22
70	23,4	22,9	23,3	23,3	23,0	23,2	5,27
80	26,0	25,2	26,0	25,7	25,1	25,6	6,80
90	28,7	27,6	27,6	27,5	26,8	27,6	8,27

Mw = $3,78 \cdot 10^6$ Dalton

Mn = $2,09 \cdot 10^6$ Dalton

Mw/Mn = 1,8

(f_i , fracción de distribución; $s_{i20,w}^c$, coeficiente de sedimentación para las distintas concentraciones: $c_1 = 27 \mu\text{g/ml}$, $c_2 = 21 \mu\text{g/ml}$, $c_3 = 17 \mu\text{g/ml}$, $c_4 = 14 \mu\text{g/ml}$, $c_5 = 11 \mu\text{g/ml}$; $s_{i20,w}^0$, coeficiente de sedimentación extrapolado a concentración cero; Mi, masa molecular; Mw, masa molecular promedio en peso; Mn, masa molecular promedio en número; Mw/Mn, grado de heterogeneidad).

va una menor heterogeneidad, así como una mayor simetría en la distribución de las masas moleculares, lo que da lugar a una buena concordancia entre el valor de la masa molecular correspondiente al 50% del gradiente de concentración y el promedio en peso, M_w , calculado para el conjunto de la distribución.

Al igual que en caso del DNA nativo, se repitieron los cálculos anteriores prescindiendo de la corrección radial, llegándose a las mismas conclusiones que allí, es decir, se constató la escasa importancia de este efecto (tabla X).

Asimismo se hicieron los cálculos de M_i^C a partir de los $s_{i,20,w}^C$ obtenidos a cada concentración, no observándose tampoco en este caso variaciones apreciables como consecuencia del efecto de concentración (tabla XI). Se promediaron entonces los valores M_i^C de cada fracción, obteniéndose unos valores \bar{M}_i y unos promedios para la distribución que, como era lógico esperar, no difieren apenas de los deducidos a partir de las $s_{i,20,w}^O$.

TABLA X

Caracterización del DNA desnaturalizado prescindiendo de corrección radial

f_i (%)	$s_{i20,w}^c$ (S)					$s_{i20,w}^o$ (S)	Mi($\times 10^6$)
	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5		
10	10,4	10,3	10,4	10,4	10,9	10,5	0,67
20	14,1	12,8	13,0	13,2	13,7	13,4	1,26
30	15,3	15,2	15,7	15,3	16,4	15,6	1,88
40	17,6	17,4	18,0	17,7	18,6	17,9	2,68
50	20,0	19,8	20,1	19,9	20,4	20,0	3,61
60	22,3	22,1	22,0	22,1	21,8	22,1	4,63
70	24,9	24,7	24,8	22,8	23,9	24,2	5,89
80	28,4	27,7	27,7	24,2	26,3	26,9	7,79
90	31,3	30,8	30,4	29,0	28,5	30,0	10,3

Mw = $4,29 \cdot 10^6$ Dalton

Mn = $2,21 \cdot 10^6$ Dalton

Mw/Mn = 1,8

(f_i , fracción de distribución; $s_{i20,w}^c$, coeficiente de sedimentación para las distintas concentraciones: $c_1 = 27 \mu\text{g/ml}$, $c_2 = 21 \mu\text{g/ml}$, $c_3 = 17 \mu\text{g/ml}$, $c_4 = 14 \mu\text{g/ml}$, $c_5 = 11 \mu\text{g/ml}$; $s_{i20,w}^o$, coeficiente de sedimentación extrapolado a concentración cero; Mi, masa molecular; Mw, masa molecular promedio en peso; Mn, masa molecular promedio en número; Mw/Mn, grado de heterogeneidad).

TABLA XI

Masas moleculares de DNA desnaturalizado calculadas con corrección radial

f_i (%)	M_i^c ($\times 10^6$)					M_i ($\times 10^6$)
	c_1	c_2	c_3	c_4	c_5	
10	0,636	0,622	0,650	0,640	0,736	0,657
20	1,40	1,07	1,13	1,14	1,32	1,21
30	1,71	1,64	1,81	1,69	2,08	1,71
40	2,41	2,30	2,55	2,47	2,86	2,52
50	3,24	3,08	3,29	3,33	3,56	3,30
60	4,25	4,01	4,13	4,37	4,22	4,20
70	5,37	5,12	5,34	5,33	5,17	5,27
80	7,08	6,55	7,09	6,84	6,45	6,80
90	9,15	8,26	8,23	8,15	7,67	8,29
<hr/>						
$M_w = 3,92$		$M_w = 3,63$	$M_w = 3,80$	$M_w = 3,77$	$M_w = 3,78$	$\bar{M}_w = 3,78$
$M_n = 2,11$		$M_n = 1,95$	$M_n = 2,06$	$M_n = 2,04$	$M_n = 2,28$	$\bar{M}_n = 2,09$

(f_i , fracción de distribución; M_i^c , masa molecular calculada a las distintas concentraciones: $c_1 = 27 \mu\text{g/ml}$, $c_2 = 21 \mu\text{g/ml}$, $c_3 = 17 \mu\text{g/ml}$, $c_4 = 14 \mu\text{g/ml}$, $c_5 = 11 \mu\text{g/ml}$; \bar{M}_i , promedio de las masas moleculares anteriores; \bar{M}_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número).

3.2. RADIOSENSIBILIDAD DEL DNA

Una vez caracterizado el DNA se procedió al estudio de su radiosensibilidad, evaluando las rupturas dobles y sencillas inducidas por distintas dosis de radiación, con el fin de obtener datos comparativos respecto a la acción de los modificadores ensayados posteriormente.

3.2.1. Influencia de la concentración sobre la sedimentación de muestras irradiadas

Previamente a las pruebas de radiosensibilidad propiamente dichas, y con el fin de establecer mejor las condiciones de trabajo definitivas, se estudió la influencia de la concentración sobre la velocidad de sedimentación de muestras irradiadas, dada la escasa dependencia entre s y c puesta de manifiesto en los experimentos de caracterización. Concretamente, el objeto de este estudio fue considerar hasta qué grado podría repercutir en los valores obtenidos para el número de rupturas el hecho de realizar los cálculos a partir de una distribución correspondiente a una concentración suficientemente baja, en lugar de deducirlos a partir de los valores de extrapolación a concentración cero.

Con este fin, se tomaron alícuotas de una muestra de DNA nativo previamente irradiado a una dosis incluída dentro del rango de irradiación aplicado en los estudios posteriores, y a partir de ellas se prepararon muestras a concentraciones distintas, las cuales se destinaron a ultracentrifugación. Se determinó el coeficiente de sedimentación medio, $s_{20,w}^0$, de estas muestras así como las distribuciones integrales de coe-

ficientes de sedimentación. Estas distribuciones, a su vez, se extrapolaron a condiciones de concentración cero, de la misma manera que en el caso de la caracterización del DNA nativo.

En la tabla XII aparecen los resultados obtenidos, representándose en la fig. 20 la variación de los $s_{i20,w}^c$ con la concentración. Como puede observarse, existe en este caso una menor dependencia de la concentración que en el DNA no irradiado (véase 3.1.2.1.). Concretamente, y considerando sólo la variación entre el valor del $s_{20,w}$ correspondiente a 25 $\mu\text{g/ml}$ y el extrapolado a condiciones de concentración cero, se puede observar que mientras éste experimenta un incremento de un 8,7% en el caso del DNA nativo no irradiado (véase 3.1.1.1.), para el irradiado el incremento se reduce a un 2,5%. Esto no es sino una confirmación más del hecho de que la dependencia del coeficiente de sedimentación respecto de la concentración disminuye conforme se hace menor la masa molecular del DNA.

A continuación se realizaron cálculos de rupturas a partir de los datos correspondientes a las distintas concentraciones de centrifugación del DNA irradiado, referidas a valores del control correspondientes también a distintas concentraciones de centrifugación (todas ellas, no obstante, en un rango inferior a 30 $\mu\text{g/ml}$). Se pudo observar que las diferencias obtenidas en las distintas posibilidades de combinación correspondían en todo caso a un orden de magnitud inferior al habitualmente encontrado para las rupturas (10^{-6} rupturas dobles/nucleótido par), quedando por debajo de los valores "umbral" significativos que se calcularon y que se detallarán más adelante (véase 3.2.3.1.).

TABLA XII

Influencia de la concentración en la sedimentación del DNA irradiado nativo

f_i (%)	$s_{i20,w}^c$ (S)					$s_{i20,w}^o$ (S)	ks_i (dl/g)	$Mi(x10^6)$
	c_1	c_3	c_4	c_5				
10	13,2	13,2	14,1	13,4		13,3	-	2,47
20	16,7	16,6	17,7	16,1		16,8	0,20	4,66
30	19,6	19,7	20,7	19,3		20,2	0,33	7,57
40	22,2	22,2	23,2	22,1		23,0	0,45	10,6
50	24,4	24,8	25,8	25,0		26,0	0,79	14,4
60	26,6	27,3	27,4	27,4		29,0	0,89	18,9
70	28,9	29,8	29,8	30,8		32,3	1,1	24,6
80	31,7	33,4	33,7	34,7		37,0	1,3	34,4
90	35,8	38,5	38,6	39,2		42,6	1,5	48,1

$Mw = 18,4 \cdot 10^6$ Dalton

$Mn = 8,50 \cdot 10^6$ Dalton

$Mw/Mn = 2,2$

(f_i , fracción de distribución; $s_{i20,w}^c$, coeficiente de sedimentación para las distintas concentraciones: $c_1 = 34 \mu g/ml$, $c_3 = 24 \mu g/ml$, $c_4 = 19 \mu g/ml$, $c_5 = 15 \mu g/ml$; $s_{i20,w}^o$, coeficiente de sedimentación extrapolado a concentración cero; ks_i , pendiente de la recta de extrapolación; Mi , masa molecular; Mw , masa molecular promedio en peso; Mn , masa molecular promedio en número; Mw/Mn , grado de heterogeneidad).

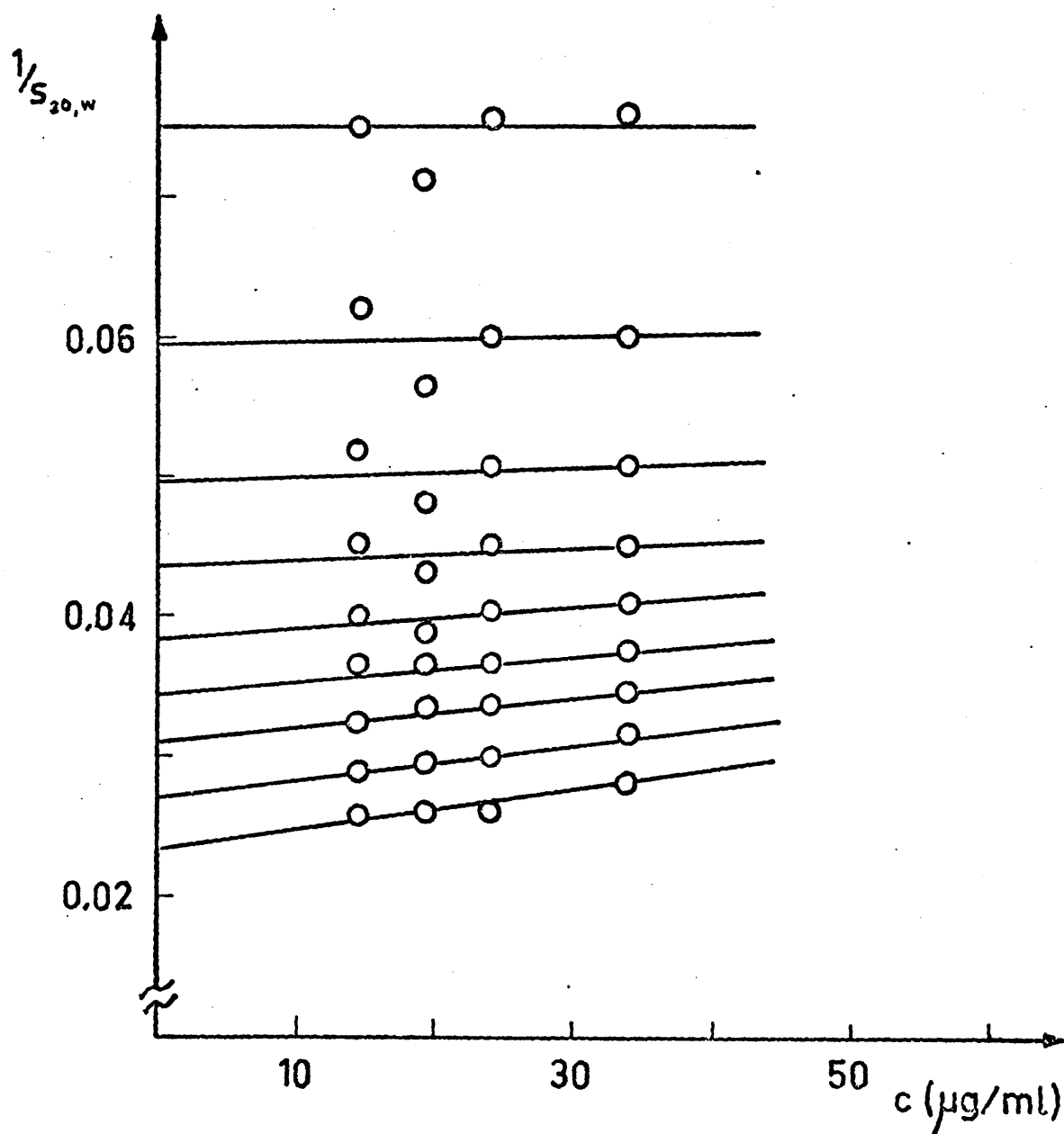


Figura 20.- Extrapolación a concentración cero de los coeficientes de sedimentación correspondientes a las fracciones (f_i) de distribución del DNA irradiado.

Por todos estos motivos, se consideró justificado efectuar todos los experimentos ulteriores de sedimentación del DNA nativo a una concentración fija de $25 \mu\text{g/ml}$, prescindiendo, por consiguiente, de la extrapolación a concentración cero. Esta forma de proceder se puede encontrar en otros trabajos clásicos de irradiación de DNA (33), en los que incluso la variación con la concentración del coeficiente de sedimentación correspondiente al 50% del gradiente de concentración es superior al mencionado 8,7% del presente trabajo.

En el caso del DNA desnaturalizado, debido a que no se observó influencia de la concentración en el estudio de caracterización (véase 3.1.1.2. y 3.1.2.2.) no se realizaron, como es evidente, estudios de este tipo para muestras irradiadas, fijándose una concentración de $20 \mu\text{g/ml}$ para todos los experimentos posteriores de sedimentación, forma de proceder encontrada también en otros trabajos (34).

3.2.2. Efecto de diferentes dosis de radiación sobre el DNA

Se suministraron 11 dosis distintas de radiación, incluídas en un rango comprendido entre 4 y 50 Krad, a disoluciones de DNA que presentaban la concentración establecida de $200 \mu\text{g/ml}$.

3.2.2.1. Rupturas dobles

En la tabla XIII se muestran los datos deducidos de la sedimentación de las muestras irradiadas de DNA nativo, para cada una de las dosis recibidas.

TABLA XIII

Radiosensibilidad del DNA nativo

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$M_n(x10^6)$	$B_2 (x10^{-5})$	
				a)	b)
0	$25,7 \pm 0,5$	$15,4 \pm 0,6$	$8,01 \pm 0,33$	-	-
4,06	23,0	10,0	6,41	1,13	1,93
11,16	20,0	6,44	4,81	3,15	5,16
16,24	19,1	6,08	4,43	4,22	6,25
18,27	18,9	6,11	4,44	4,22	6,22
24,36	16,9	4,86	3,35	8,53	10,8
25,37	15,5	3,69	2,48	14,5	17,3
30,45	15,2	3,55	2,32	16,4	19,0
32,48	14,5	2,98	2,09	18,1	21,9
36,54	13,7	2,62	1,72	24,6	28,3
39,58	12,2	1,82	0,990	53,1	54,9
45,67	11,1	1,42	0,839	61,7	66,1

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_2 , frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

Aunque en la tabla figuran los coeficientes de sedimentación medios, $s_{20,w}^0$, los demás valores que aparecen, relativos a promedios de masa molecular y frecuencias de rupturas, están calculados a partir de las distribuciones integrales de coeficientes de sedimentación y masas moleculares que, como se sabe, se realizaron siempre en cada experimento. Por otra parte, debido a que en los experimentos de centrifugación se introducía un control junto con las muestras irradiadas, y que las variaciones observadas en los datos correspondientes a estos controles no afectaron de forma significativa a los números de rupturas, el cálculo de éstas se realizó finalmente frente a promedios de los valores referentes a esos controles, promedios que son los que figuran en la tabla.

En relación con los cálculos de rupturas, puede observarse que existen variaciones en los correspondientes valores, según se hayan calculado mediante la expresión de Charlesby (ecuación 1.18) o a partir de la que únicamente considera los promedios en número de la masa molecular (ecuación 1.19). La expresión de Charlesby, pese a ser más rigurosa por incluir promedios en peso y en número de masa molecular, fue considerada con ciertas reservas, debido a que en ocasiones, para DNA nativo irradiado a dosis bajas, proporciona valores negativos de rupturas, hecho que no tiene sentido, por tratarse de muestras en las que los valores de M_w y M_n son inferiores a los M_{w_0} y M_{n_0} del control correspondiente. Esta puede ser una de las razones por las que en muchos trabajos (33) (34) se utiliza únicamente la expresión de promedios en número para el cálculo de rupturas. No obstante, en la sucesiva exposición de resultados se seguirán mostrando los valores deducidos de ambas fórmulas, con objeto de discutir, en cada caso, las discrepancias

observadas.

Otro hecho que se observa ya aquí, y que va a ser general en todo el trabajo, es que a dosis elevadas, pequeñas variaciones en las masas moleculares del material irradiado tienen una gran repercusión sobre el número de rupturas calculadas frente a un control determinado. Por el contrario, apenas se detectan diferencias apreciables cuando las rupturas correspondientes a una muestra irradiada se calculan refiriéndolas a controles distintos. Esta es, por consiguiente, una de las razones que explican, tanto la decisión de establecer una concentración fija para los experimentos de sedimentación, como el hacer cálculos de rupturas frente a valores promediados de varios controles. Las diferencias observadas en los valores de éstos, que por otra parte son los que más acusan los efectos de concentración, resultan irrelevantes a la hora de medir los efectos de la radiación, debido a que se trata de órdenes de magnitud diferentes.

Como consecuencia de todo esto, se estimó de interés conocer desde qué valores las rupturas se podrían considerar como significativas. Con este fin, se calculó el número de "rupturas" virtuales a que daría lugar la comparación de los valores de M_w y M_n calculados a partir de los datos obtenidos a las distintas concentraciones de centrifugación estudiadas en la caracterización del DNA, con los M_w^0 y M_n^0 deducidos de los valores extrapolados a condiciones de concentración cero. Los valores máximos que se obtuvieron fueron de $1,04 \cdot 10^{-5}$ rupturas dobles/nucleótido para M_w y de $1,95 \cdot 10^{-5}$ rupturas dobles/nucleótido para M_n según la fórmula de promedios en número, datos que dan una

idea de lo que puede ser los valores "umbral" significativos a considerar en los calculos sucesivos de rupturas.

En la fig. 21 se representan los valores de rupturas dobles/nucleótido par, B_2 , de la tabla XIII frente a las correspondientes dosis en Krad. Puede observarse una dependencia cuadrática con la dosis, hecho que no hace sino confirmar que en estas condiciones de irradiación, las rupturas dobles se producen como consecuencia de la coincidencia, más o menos estricta, de dos rupturas sencillas en las cadenas opuestas del DNA según se ha visto ya en 1.3.2.3.

Para proceder al cálculo de la ecuación correspondiente a la gráfica anterior se siguió el método empleado por Hagen (33) en relación con la determinación de los parámetros de la ecuación (1.25), que es la que rige este proceso:

$$B_2 = (\beta + kD)^2 \cdot n$$

En primer lugar, el término β , correspondiente a las rupturas simples de cadena presentes antes de la irradiación, se supone despreciable para dosis altas de irradiación. Teniendo entonces en cuenta el valor de k que se obtiene del estudio de las rupturas simples producidas por las mismas dosis, puede calcularse, para cada uno de los valores experimentales de B_2 un valor n que, como se sabe, corresponde al número total de pares de nucleótidos que se desestabilizan alrededor de una ruptura simple. Obtenidos los diferentes valores de n se establece un valor promedio, \bar{n} , que es el que se considera como parámetro de la ecuación. De esta manera se pueden "recalcular" los

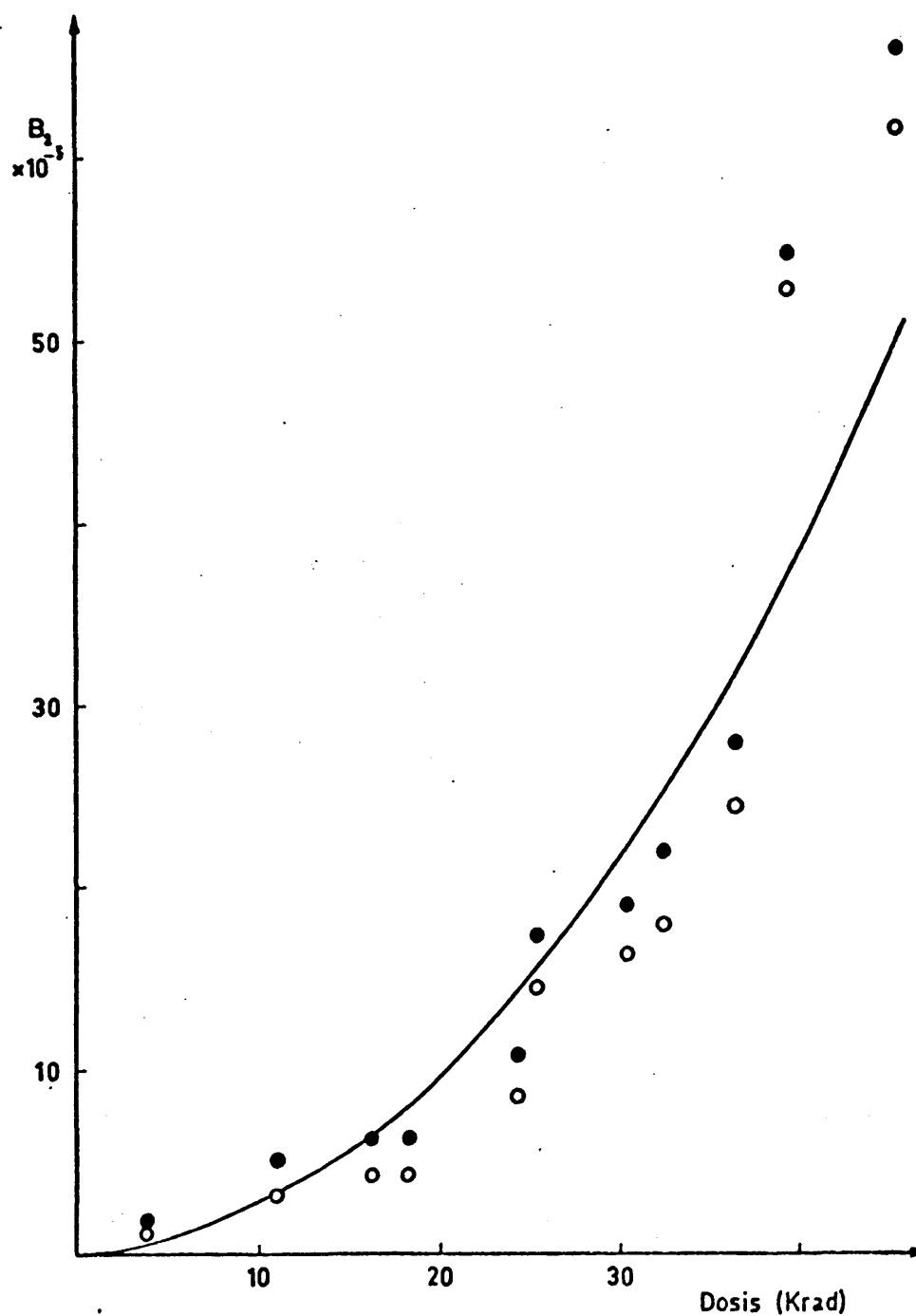


Figura 21.- Dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas dobles por nucleó-
tido par, B_2 , del DNA (o, valores calculados según la ecuación (1.18);
•, idem, según la ecuación (1.19);—, curva ajustada según la ecuación
(1.25)).

números de rupturas correspondientes a las dosis suministradas, obteniéndose una curva, que se puede considerar como la curva teórica del conjunto.

Los resultados obtenidos para las distintas n , partiendo del valor $k = 2,0 \cdot 10^{-7} \text{ rad}^{-1}$ deducido del estudio de las rupturas simples efectuado en experimentos inmediatamente posteriores (véase 3.2.3.2.), dieron un valor de $\bar{n} = 5,58$. Considerando este valor como $n = 6$, se obtuvieron los puntos que forman la línea continua de la gráfica anterior, la cual, por consiguiente, responde a la ecuación:

$$B_2 = 2,4 \cdot 10^{-13} D^2$$

en donde D viene expresada en rad.

3.2.2.2. Rupturas simples

De una forma análoga, en la tabla XIV se presentan los datos de sedimentación de las muestras que fueron desnaturalizadas después de la irradiación.

En la fig. 22 se representan los valores de rupturas simples/nucleótido, B_1 , frente a las dosis recibidas. La representación, en este caso, se ajusta a una recta, hecho que confirma la información bibliográfica (33) (37). De la pendiente de la recta, deducida de forma gráfica, se obtiene un valor de $k = 2,0 \cdot 10^{-7} \text{ rad}^{-1}$ (probabilidad de ruptura por nucleótido y por rad), con lo que la ecuación (1.20) adopta la forma:

TABLA XIV

Radioradiosensibilidad del DNA desnaturalizado

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$M_n(x10^6)$	$B_1 (x10^{-3})$	
				a)	b)
0	$19,7 \pm 0,2$	$4,04 \pm 0,15$	$1,96 \pm 0,08$	-	-
4,06	9,6	0,550	0,411	0,47	0,60
11,16	7,0	0,228	0,56	1,59	1,83
16,24	6,0	0,157	0,103	2,55	2,86
18,27	5,7	0,134	0,0877	3,01	3,38
24,36	5,0	0,0977	0,0511	5,82	5,91
25,37	4,7	0,0823	0,0539	4,99	5,59
30,45	4,6	0,0765	0,0465	6,03	6,51
32,48	4,7	0,0808	0,0418	7,17	7,26
36,54	4,5	0,0780	0,0405	7,39	7,49
39,58	4,4	0,0763	0,0441	6,50	6,87
45,67	3,7	0,0485	0,0238	13,0	12,9

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_1 , frecuencia de rupturas simples por nucleótido, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

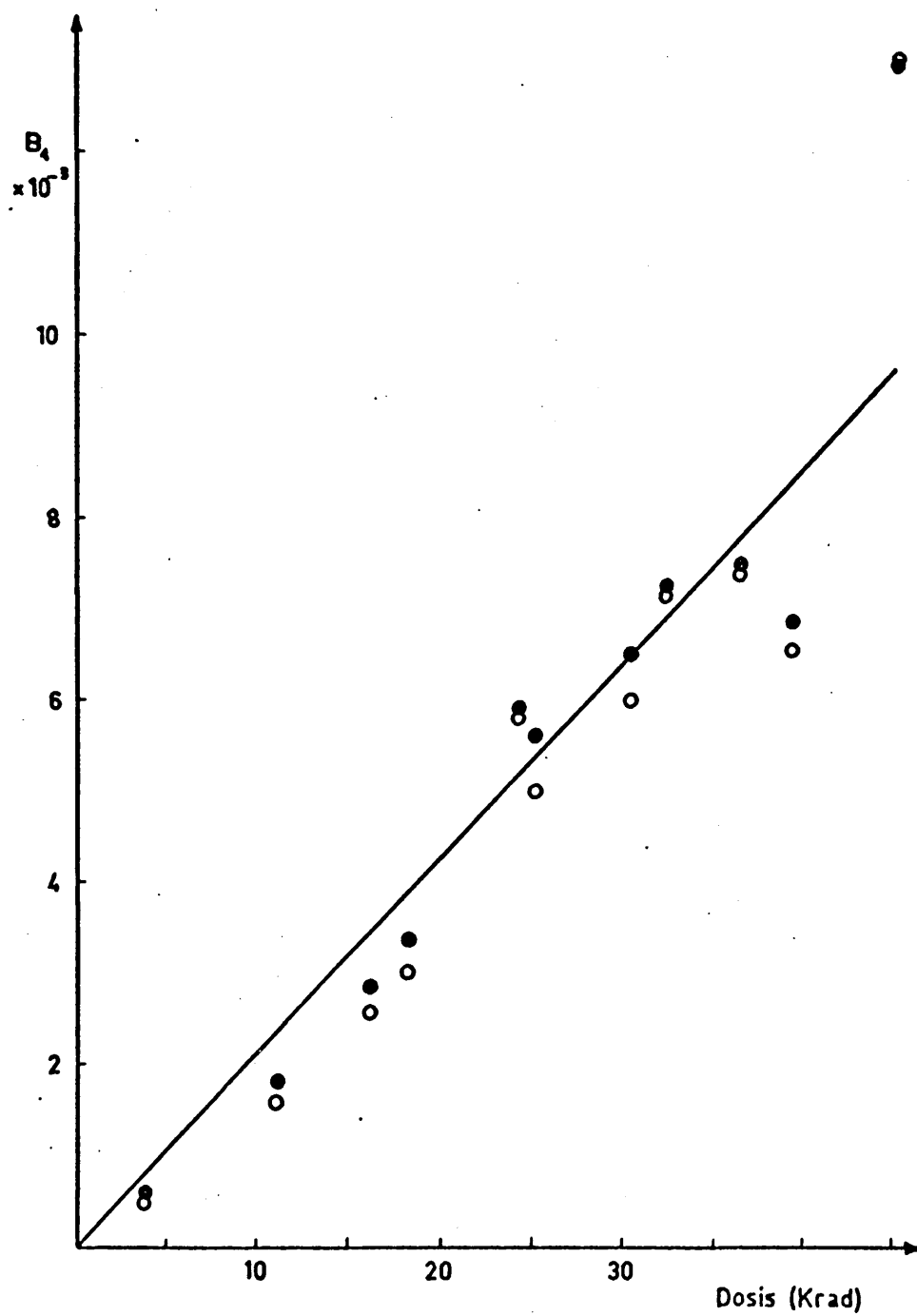


Figura 22.- Dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas simples por nucleótido, B_1 , del DNA. (\circ , valores calculados según la ecuación (1.18); \bullet , idem, según la ecuación (1.19);— ajuste gráfico)).

$$B_1 = 2,0 \cdot 10^{-7} D$$

siempre que D se exprese en rad.

3.3. MODIFICADORES DEL EFECTO DE LA RADIACION

3.3.1. Daunomicina

En los ensayos previos efectuados a relaciones DNA:antibiótico de 3,5:1 y 8,7:1 se pudo comprobar espectrofotométricamente la formación del complejo DNA-daunomicina. No obstante, dado que las variaciones espectrales resultan más difíciles de estudiar a la relación 3,5:1, y que el efecto de las sales NaCl y KCl sobre la absorbancia del complejo a 470 nm es mayor para relaciones inferiores a 8,7:1 (55), se eligió para todos los trabajos posteriores la relación de 8,7:1.

En la fig. 23 se puede comprobar espectrofotométricamente la formación del complejo DNA-daunomicina a la relación mencionada de 8,7:1. Se observa un desplazamiento en el máximo del antibiótico, de 475 a 500 nm. Asimismo puede observarse un desplazamiento en el máximo del DNA desde 260 nm hacia longitudes de onda menores, junto con un incremento en la absorbancia, producido por solapamiento con la absorbancia del antibiótico en esa región del espectro. El máximo que la daunomicina presenta a 333 nm queda enmascarado, al coincidir con una zona de mínimo del DNA y estar presente el antibiótico en mucha menor proporción.

Las diálisis con $MgCl_2$, efectuadas con objeto de disociar el complejo y eliminar la daunomicina, fueron exhaustivas, y como consecuencia de ellas se observó un notable descenso en la coloración de las muestras del complejo. Esto apoya las opiniones encontradas en la

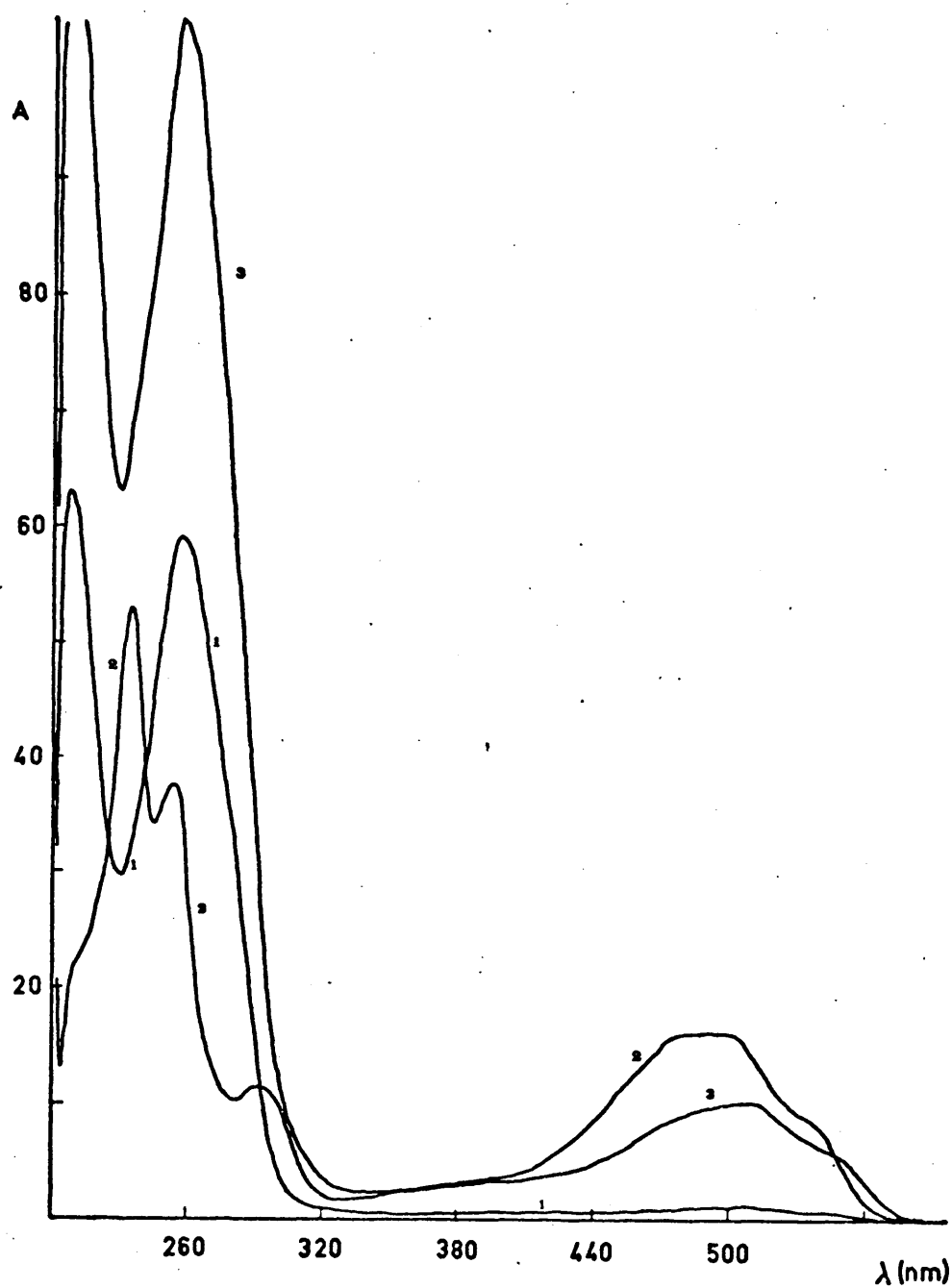


Figura 23.- Espectros comparativos de : 1) DNA ($25 \mu\text{g/ml}$); 2) Daunomicina ($9,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$); 3) DNA-daunomicina (relación 8,7:1, para $25 \mu\text{g/ml}$ en DNA y $9,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ en antibiótico). Rango de absorbancia: 0-2 U.D.O. Rango fotométrico: 0,5.

bibliografía acerca de la existencia de fuerzas electrostáticas en la formación del complejo (59). Sin embargo, el hecho de que las diálisis no consiguieran nunca una decoloración total de las muestras implica, a su vez, una parcial irreversibilidad para el complejo formado. Por estos motivos, los estudios de sedimentación se realizaron, tanto con muestras sin dializar como con muestras que fueron sometidas a diálisis después de la irradiación. En cuanto a la desnaturalización, ésta se presentó sin problemas, pudiéndose observar como consecuencia de ella la desaparición total del pico de absorbancia característico de la daunomicina.

Por lo que respecta a los resultados de sedimentación (tablas XV y XVI), los controles de complejo no dializados mostraron unos valores de coeficientes de sedimentación ligeramente inferiores a los del DNA control, lo que también se encuentra de acuerdo con la bibliografía (55) (56). Sin embargo, el hecho de efectuar la centrifugación de las muestras irradiadas con diálisis o sin ella no mostró ninguna influencia a la hora de calcular las rupturas inducidas por la irradiación frente a controles que hubieran sufrido el mismo proceso. Como puede observarse en las figuras 24 y 25, los valores de rupturas relativos a muestras irradiadas, dializadas y no dializadas, quedan intercaladas entre sí, permitiendo trazar una misma curva efecto-dosis, tanto para las rupturas dobles como para las sencillas.

A la vista de los resultados de sedimentación se puede deducir, por consiguiente, que existe un notable efecto de radiosensibilización del DNA por parte de la daunomicina, manifestado en el fuerte incremento de rupturas dobles y sencillas producidas sobre la molécula del DNA. Hay que hacer notar aquí que a altas dosis de radiación, los

TABLA XV

Efecto de la daunomicina en los datos de sedimentación del DNA nativo

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$M_n(x10^6)$	$B_2 (x10^{-5})$	
				a)	b)
0 (d)	$24,4 \pm 0,9$	$12,4 \pm 1,4$	$6,69 \pm 0,99$	-	-
0 (nd)	$21,1 \pm 1,1$	$9,05 \pm 1,07$	$4,92 \pm 0,28$	-	-
6,09 (d)	15,1	3,62	2,52	12,4	15,4
6,09 (nd)	14,9	3,62	2,57	8,46	11,5
9,14 (nd)	12,0	1,91	1,24	32,8	37,3
12,18 (d)	11,0	1,60	0,70	81,9	78,3
12,18 (nd)	11,4	1,71	1,07	40,9	45,4
15,23 (d)	9,7	1,09	0,482	125	119
15,23 (nd)	9,7	1,13	0,352	186	164
18,27 (d)	9,5	0,990	0,372	172	158
21,32 (nd)	8,1	0,644	0,256	247	230
24,36 (nd)	8,9	0,831	0,259	258	227
27,41 (d)	8,3	0,691	0,181	388	333
27,41 (nd)	8,2	0,635	0,109	683	557

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_2 , frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19); (d), dializado; (nd), no dializado).

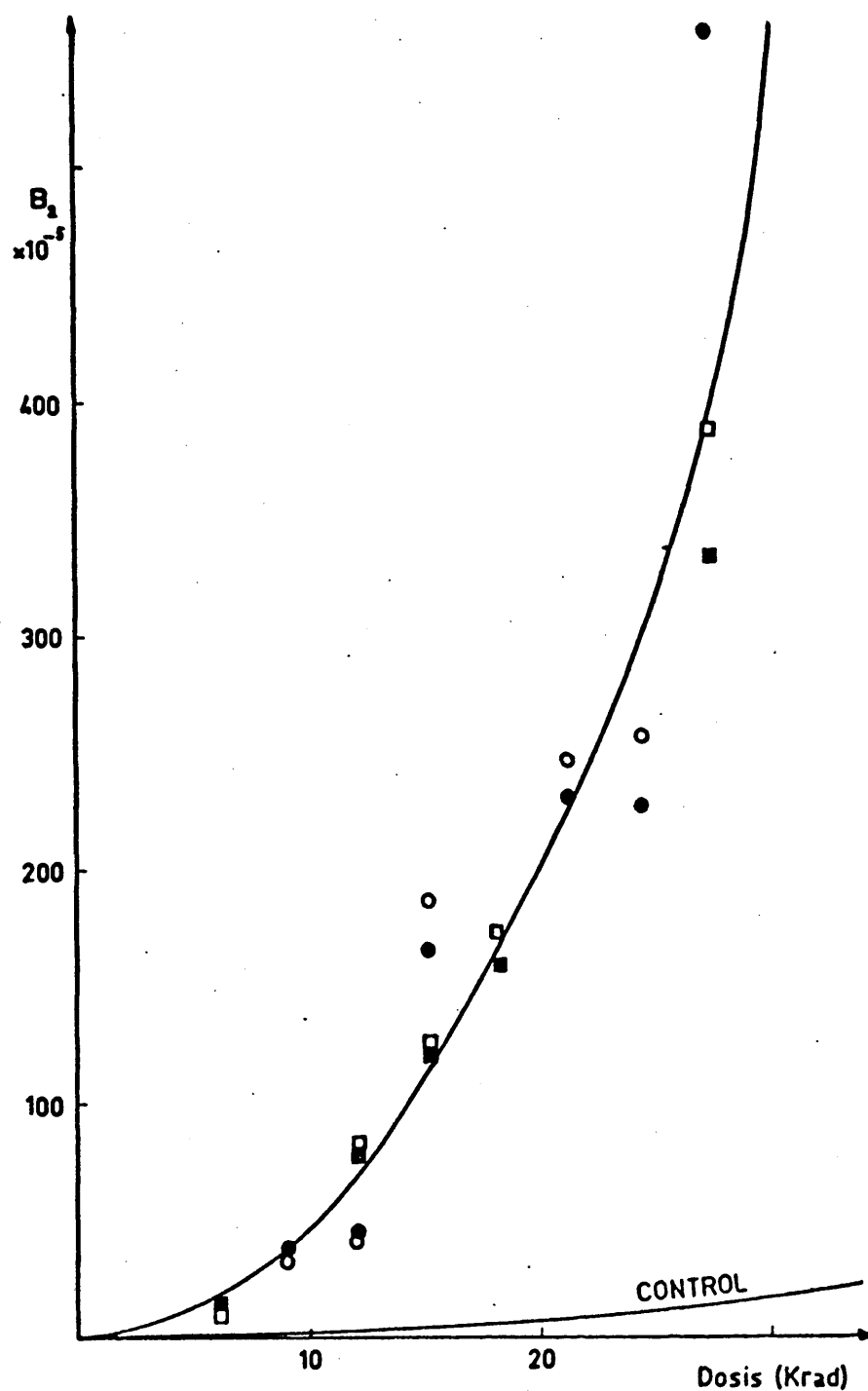


Figura 24.- Efecto de la daunomicina en la dependencia con las dosis de la frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, B_2 . (○, valores calculados según la ecuación (1.18); ●, idem, según la ecuación (1.19); ◻, idem, después de la diálisis según la ecuación (1.18); ■, idem, después de la diálisis según la ecuación (1.19)).

TABLA XVI

Efecto de la daunomicina en los datos de sedimentación del DNA desnaturalizado

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$M_n(x10^6)$	$B_1 (x10^{-3})$	
				a)	b)
0 (d + nd)	$19,6 \pm 0,6$	$4,09 \pm 0,47$	$2,10 \pm 0,18$	-	-
6,09 (d)	5,4	0,137	0,0769	3,72	3,88
6,09 (nd)	5,7	0,157	0,0957	2,86	3,09
9,14 (nd)	5,0	0,112	0,0570	5,27	5,29
12,18 (d)	4,5	0,088	0,0451	6,78	6,73
12,18 (nd)	4,6	0,0875	0,0447	6,74	6,78
15,23 (nd)	4,3	0,0714	0,0243	14,0	12,6
18,27 (d)	3,5	0,0510	0,0182	18,6	16,9
18,27 (nd)	4,0	0,0613	0,0244	13,4	12,6
21,32 (nd)	3,6	0,0485	0,0160	21,4	19,2
24,36 (d)	3,6	0,0584	0,0165	21,4	18,7
24,36 (nd)	3,5	0,0468	0,0171	19,6	18,0
27,41 (nd)	3,4	0,0405	0,00948	38,4	32,5

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_1 , frecuencia de rupturas simples por nucleótido, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19); (d), dializado; (nd), no dializado).

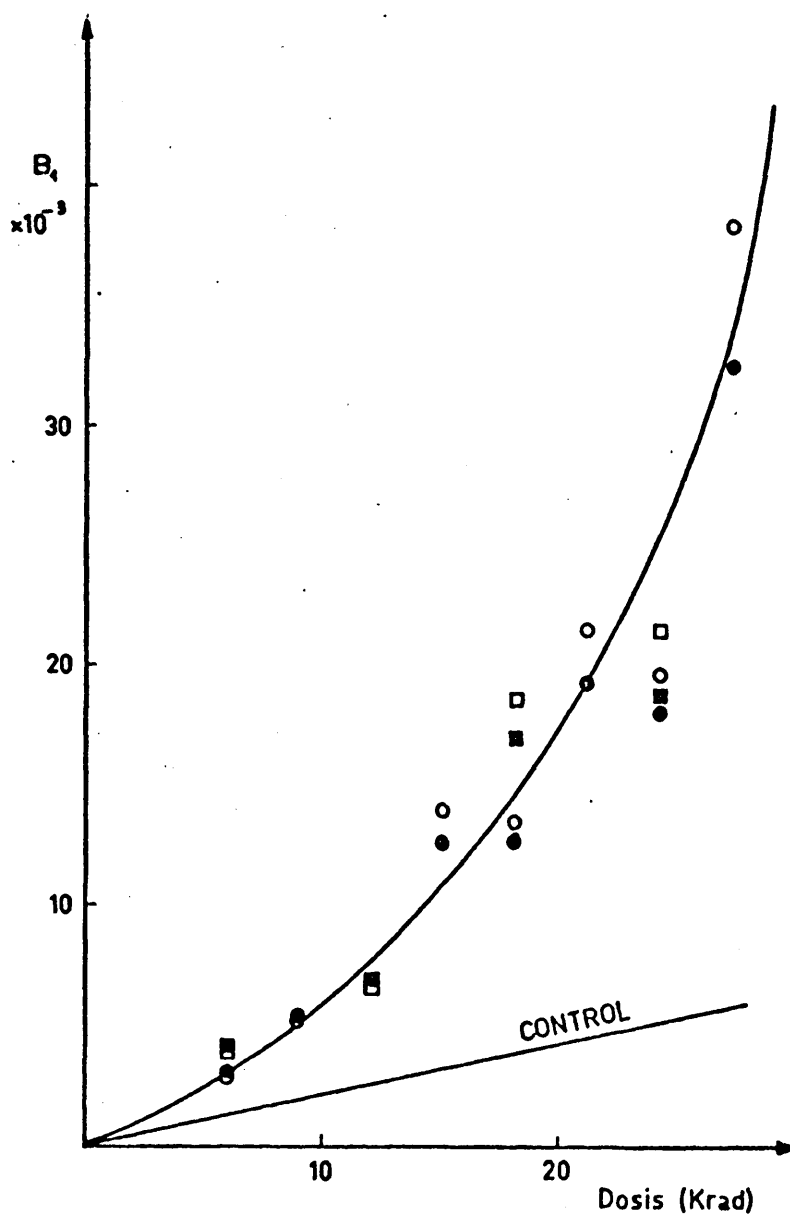


Figura 25.- Efecto de la daunomicina en la dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas simples por nucleótido, B_1 (o, valores calculados según la ecuación (1.18); ●, idem, según la ecuación (1.19); □, idem, después de la diálisis según la ecuación (1.18); ■, idem, después de la diálisis según la ecuación (1.19)).

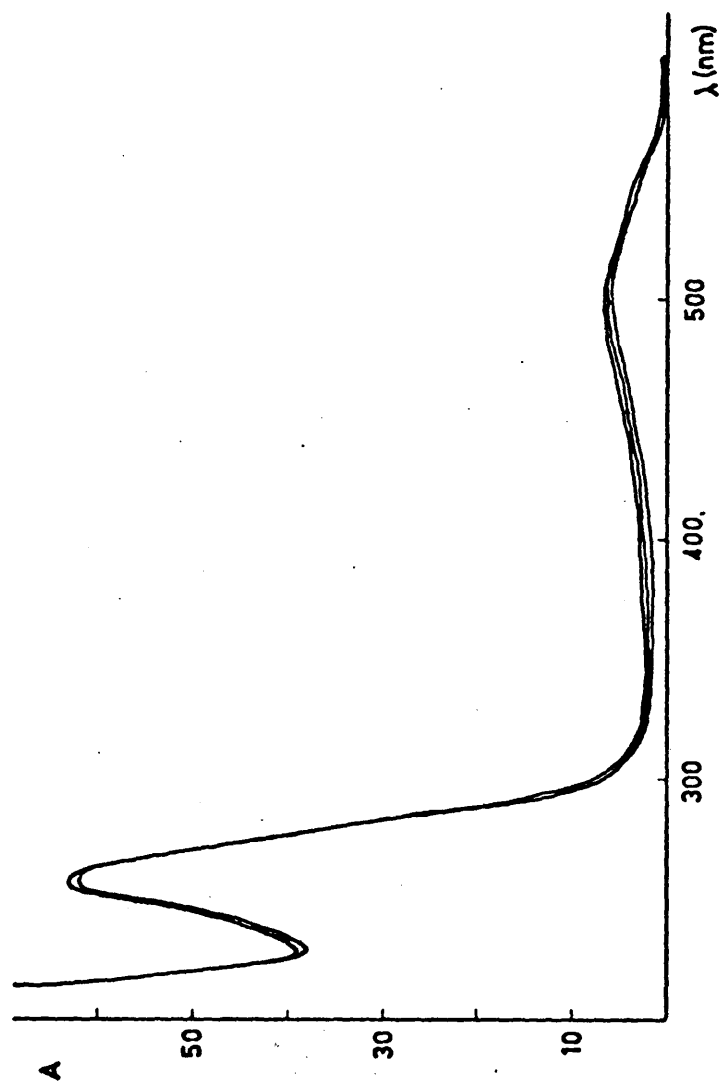


Figura 26.- Efecto de las dosis máxima (6,09 Krad) y mínima (24,36 Krad) de radiación sobre el espectro del complejo DNA-daunomicina. (25 $\mu\text{g/ml}$ en DNA y $9,5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ en antibiótico). Rango de absorbancia: 0-2 U.D.O. Rango fotométrico: 1.

valores en el número de rupturas son más divergentes, según se haya utilizado en su cálculo la ecuación (1.18) o la ecuación (1.19), divergencia ya aparecida en el estudio de radiosensibilidad del DNA (véase 3.2.3.1.). No obstante, estas diferencias no son significativas a la hora de interpretar la actividad sensibilizante de este compuesto, como lo prueba el hecho de que tanto unos valores como otros quedan muy por encima de los correspondientes a controles de DNA irradiados para igual rango de dosis.

Los datos proporcionados por los espectros, por el contrario, no muestran variaciones apreciables para el complejo irradiado, pudiéndose observar, en concreto, una gran constancia en el pico de absorción de la daunomicina (fig. 26), hecho que confirma efectivamente que el DNA es el principal receptor de la acción de la radiación, contribuyendo la daunomicina a incrementar notablemente este efecto.

3.3.2. Cromomicina A₃

La formación del complejo DNA-cromomicina A₃ se comprobó espectrofotométricamente. El máximo que presenta la cromomicina A₃ a 407 nm se transformó en una especie de meseta entre 420 y 440 nm, mientras que el máximo correspondiente a 280 nm quedó absorbido y desplazado por el del DNA a 260 nm (fig. 27). Estos datos confirmaron asimismo que la cromomicina A₃, en su unión con el DNA, no presenta la hipocromicidad característica de los compuestos que se intercalan entre las bases del DNA.

Basados en los datos bibliográficos sobre dissociabilidad del

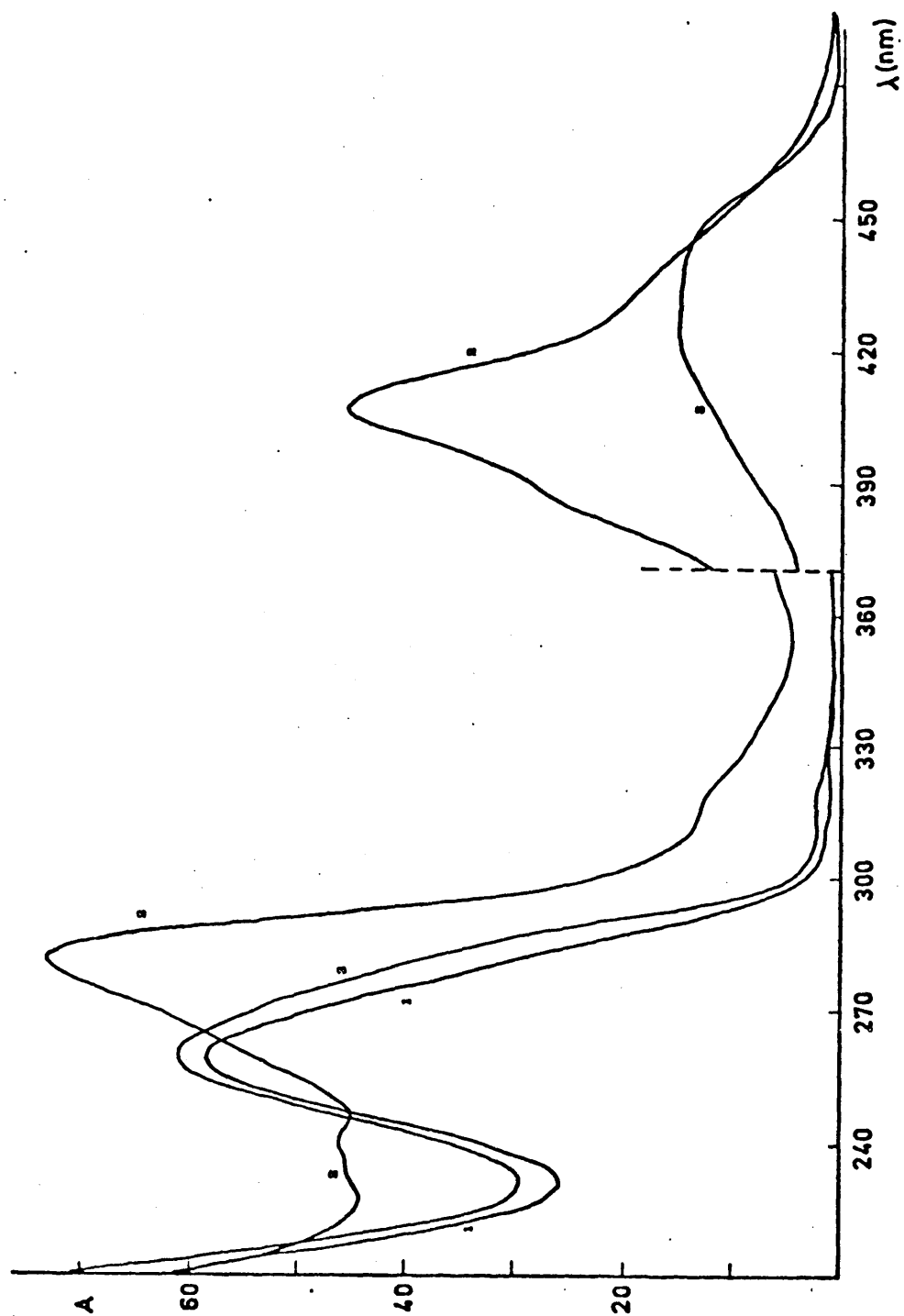


Figura 27.- Espectros comparativos de: 1) DNA (25 $\mu\text{g/ml}$); 2) Cromomicina A_3 ($3 \cdot 10^{-5}$ M); 3) DNA-cromomicina A_3 (25 $\mu\text{g/ml}$ en DNA y $1,9 \cdot 10^{-6}$ M en antibiótico). Rango de absorbancia: 0-2 U.D.O. Rango fotométrico: 0,2 (complejo en visible), 0,5 (DNA), 1 (cromomicina A_3 en visible), 2 (cromomicina A_3 en U.V. y complejo en visible).

complejo con disolventes orgánicos (67), hecho que prueba la no existencia de uniones covalentes en el complejo DNA-cromomicina A_3 , se intentó la disociación de éste con dodecil sulfato sódico al 1% y posterior diálisis frente al disolvente común. Sin embargo, surgieron dificultades en la diálisis del propio detergente, así como interferencias en el momento de la centrifugación. Teniendo en cuenta entonces que en los experimentos de sedimentación realizados quedó patente que la formación del complejo no modifica el coeficiente de sedimentación del DNA, hecho que concuerda con la información bibliográfica (56), se decidió efectuar todas las medidas de sedimentación sin diálisis previa de las muestras. Por otra parte, la desnaturalización no presentó problemas.

Los efectos de la radiación se reflejaron tanto en las lecturas espectrofotométricas como en los resultados de los estudios de sedimentación.

El máximo de absorción correspondiente al antibiótico en la zona del visible disminuye conforme aumenta la dosis de radiación (fig. 28), lo que parece indicar que se produce una degradación de la parte cromófora de la cromomicina A_3 . Por otro lado, se observa también un aumento en las absorbancias máxima y mínima del DNA con la dosis (tabla XVII), fenómeno que pudiera interpretarse como resultado de una liberación, al menos inicial, de bases nitrogenadas.

Los resultados de coeficientes de sedimentación y promedios de masas moleculares deducidos de la centrifugación de las disoluciones de complejo irradiadas aparecen en las tablas XVIII y XIX.

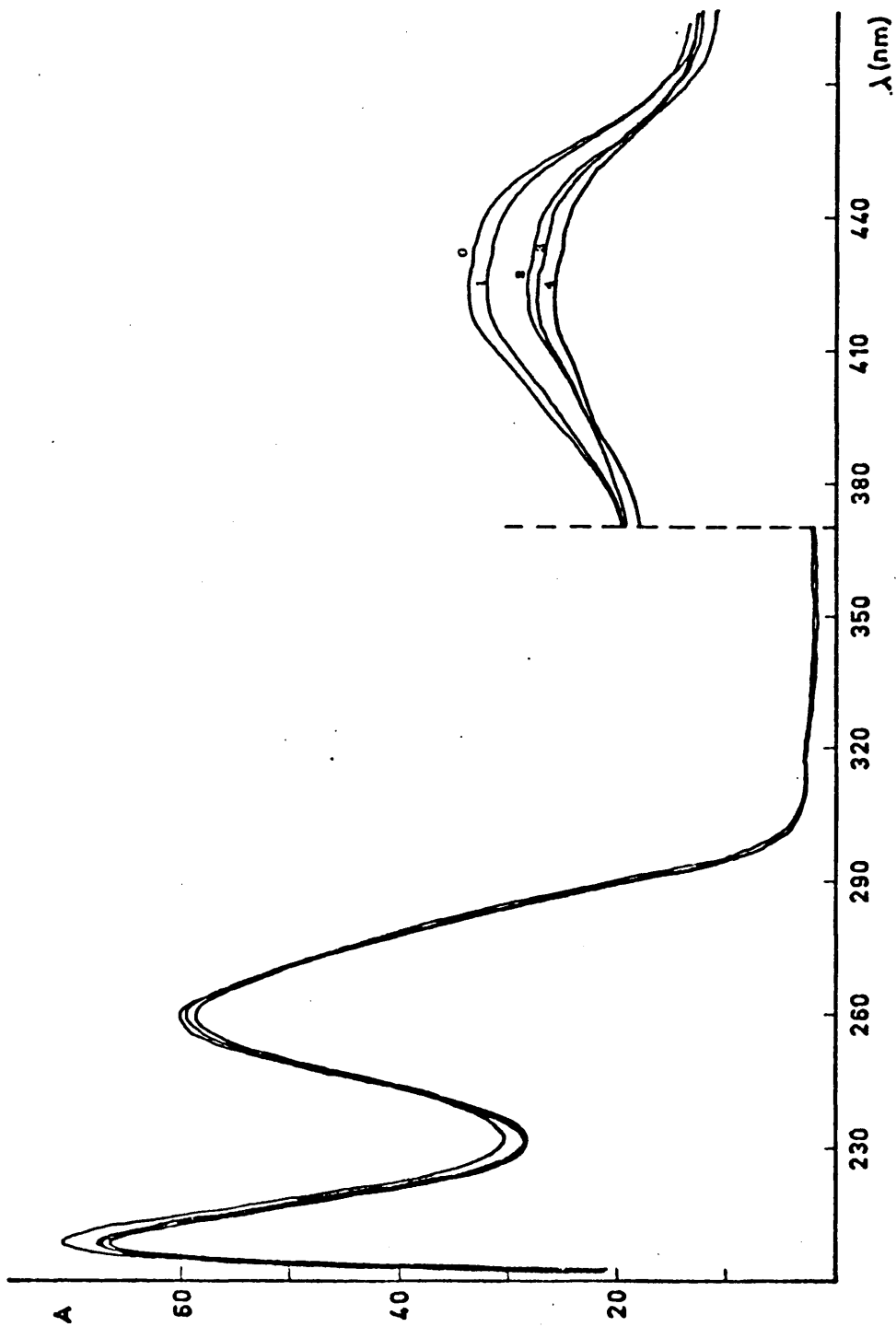


Figura 28.- Efecto de la radiación sobre el espectro del complejo DNA-cromomicina A_3 ($50 \mu\text{g/ml}$ en DNA y $3,8 \cdot 10^{-6}$ en antibiótico): 0) control; 1) 4,06 Krad; 2) 9,14 Krad; 3) 16,24 Krad; 4) 22,33 Krad. Rango fotométrico: 0,2 (en visible) y 2 (en U.V.).

TABLA XVII

Datos espectrofotométricos del complejo DNA-cromomicina A₃

Dosis (Krad)	A (U.D.O.)		ΔA (%)	
	$\lambda = 430 \text{ nm}$	$\lambda = 260 \text{ nm}$	$\lambda = 430 \text{ nm}$	$\lambda = 260 \text{ nm}$
0	0,380	1,179	-	-
4,06	0,335	1,181	- 11,84	0,17
9,14	0,325	1,194	- 14,47	1,27
16,24	0,265	1,193	- 30,26	1,19
22,33	0,230	1,207	- 39,47	2,37
0	0,405	1,190	-	-
6,09	0,335	1,202	- 17,28	1,01
15,23	0,285	1,276	- 29,63	7,23
21,32	0,256	1,466	- 36,79	23,19

TABLA XVIII

Efecto de la cromomicina A₃ en los datos de sedimentación del DNA nativo

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(10^6)$	$M_n(x10^6)$	$B_2 (x10^{-5})$	
				a)	b)
0	$26,0 \pm 0,8$	$16,1 \pm 0,7$	$8,74 \pm 1,30$	-	-
4,06	18,5	6,06	4,11	6,37	7,97
6,09	17,1	5,29	3,11	11,9	12,8
9,14	14,4	2,99	2,09	18,9	22,6
12,18	11,15	1,57	0,853	63,8	65,6
16,24	10,5	1,27	0,592	100	97,7
18,27	10,0	1,27	0,287	249	209
21,32	9,0	0,854	0,314	208	190
22,33	9,6	1,00	0,380	170	156

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_2 , frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

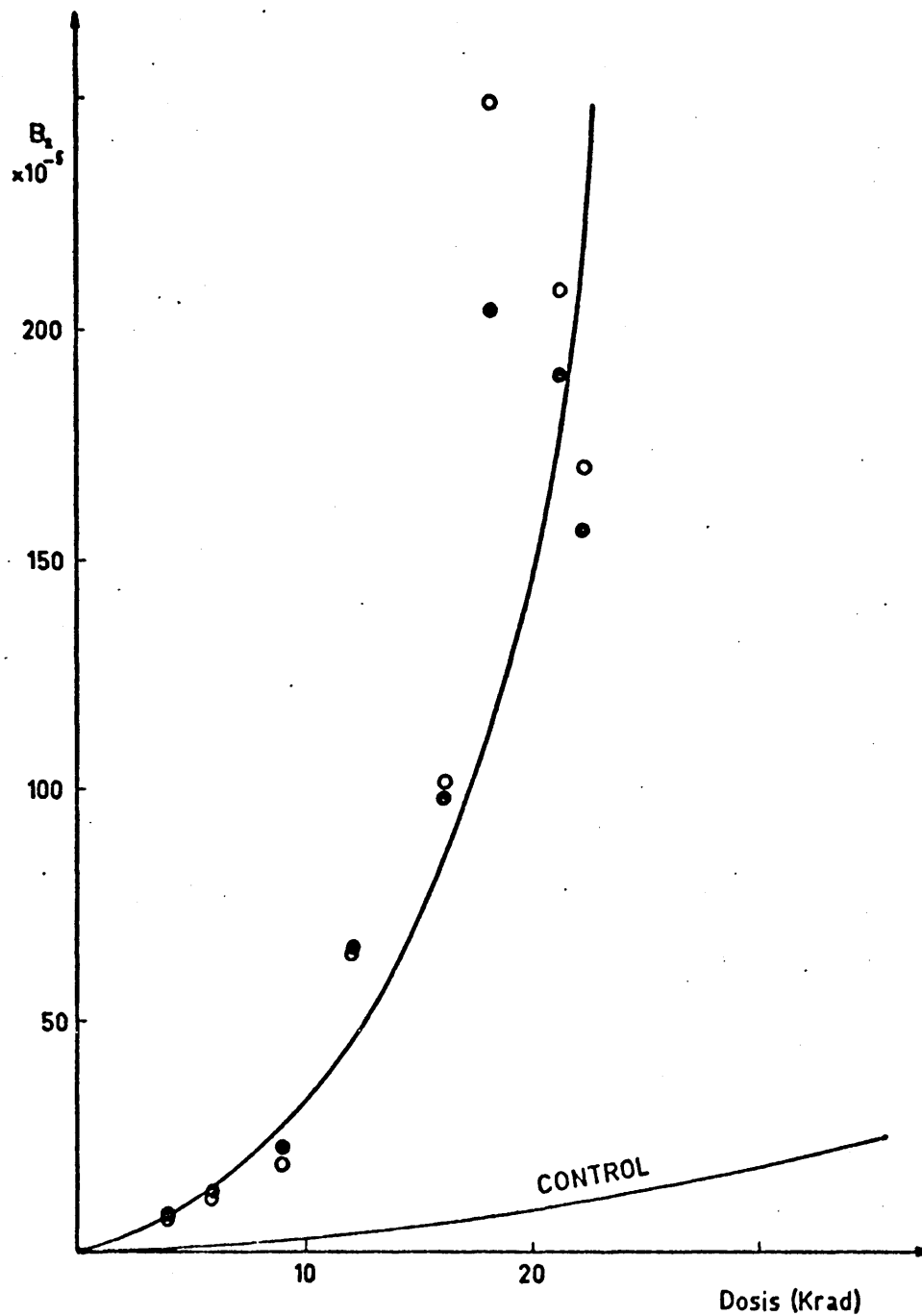


Figura 29.- Efecto de la cromomicina A_3 en la dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, B_2 (o, valores calculados según la ecuación (1.18); •, idem, según la ecuación (1.19).

TABLA XIX

Efecto de la cromomicina A_3 en los datos de sedimentación del DNA desnaturalizado

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(10^6)$	$M_n(10^6)$	$B_1 (10^{-3})$	
				a)	b)
0	$20,3 \pm 0,6$	$4,57 \pm 0,52$	$2,02 \pm 0,09$	-	-
4,06	6,0	0,151	0,0919	2,96	3,21
6,09	4,8	0,0999	0,0449	6,96	6,74
9,14	4,5	0,0806	0,0432	6,84	7,02
12,18	3,6	0,0493	0,0207	15,7	14,9
15,23	3,8	0,0571	0,0134	27,1	22,9
16,24	3,6	0,0473	0,0193	16,8	15,9
18,27	3,7	0,0518	0,0166	20,8	18,6
22,33	3,5	0,0425	0,0118	30,1	26,2
24,36	3,5	0,0464	0,00800	47,1	38,6

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_1 , frecuencia de rupturas simples por nucleótido, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

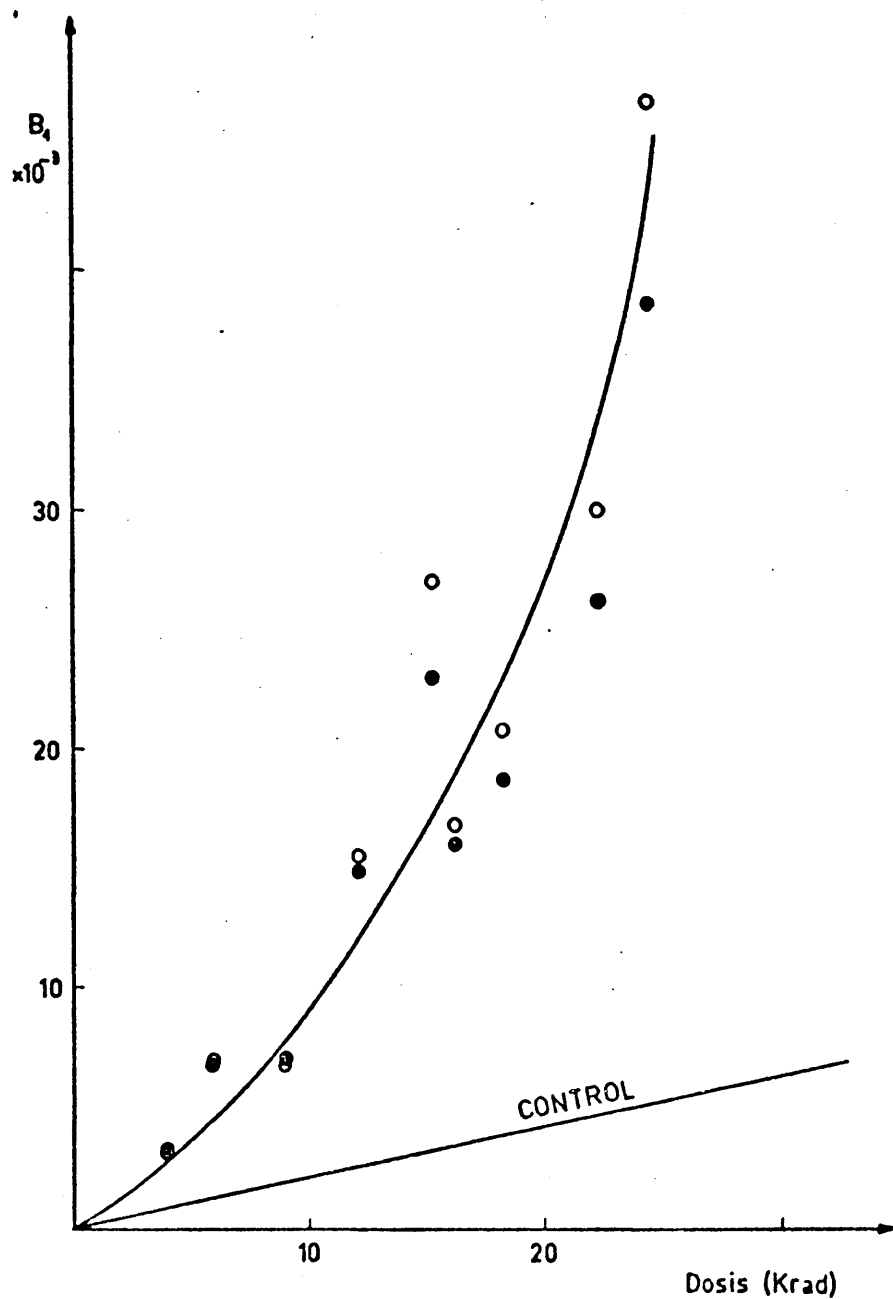


Figura 30.- Efecto de la cromomicina A_3 en la dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas simples por nucleótido, B_1 (\circ , valores calculados según la ecuación (1.18); \bullet idem, según la ecuación (1.19)).

Estos valores resultan ser muy inferiores a los inducidos por iguales dosis de radiación en disoluciones que sólo contienen DNA. Ello implica, comparándolos con los correspondientes a controles del propio complejo no irradiado, unos números de rupturas que, si se representan gráficamente frente a sus correspondientes dosis, proporcionan unas curvas (figuras 29 y 30) que se encuentran muy por encima de las del DNA irradiado.

De nuevo se observa aquí que, para dosis altas de radiación, existe una creciente divergencia entre los valores de rupturas, según la fórmula que se haya empleado en su cálculo. Concretamente, el hecho de que la fórmula de Charlesby (ecuación 1.18) proporcione números de rupturas más altos se puede atribuir a una mayor repercusión de estas dosis de radiación sobre los valores del promedio en peso. Estas variaciones, sin embargo, tampoco son obstáculo aquí para constatar el efecto claramente sensibilizante de la cromomicina A_3 , efecto que parece más acusado en el caso de las rupturas dobles.

3.3.3. Antramicina

En relación con la formación del complejo DNA-antramicina, se efectuaron ensayos previos con objeto de establecer el tiempo de incubación a 37°C. Adoptado como más adecuado un tiempo de 100 min, se pudo comprobar la formación del complejo, espectrofotométricamente, al observar que el máximo que posee la antramicina a 333 nm se desplazó hasta 343 nm (fig. 31).

Aunque la antramicina no interfiere en las lecturas espectro-

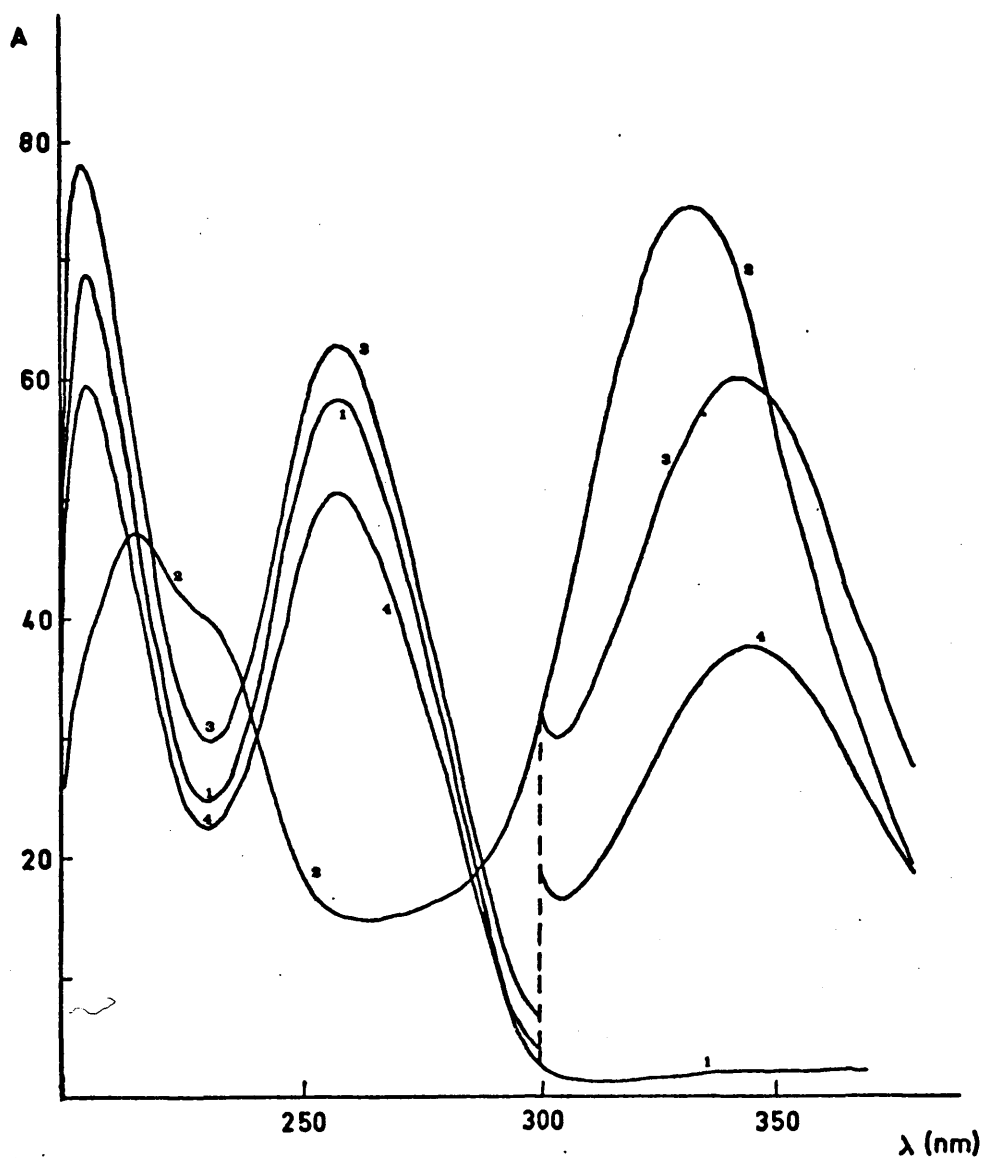


Figura 31.- Espectros comparativos: 1) DNA (25 $\mu\text{g/ml}$); 2) Antramicina (31,6 mg/ml); 3) DNA-antramicina (25 $\mu\text{g/ml}$ en DNA y 1,98 mg/ml en antibiótico); 4) Idem, dializado con MgCl_2 . Rango de absorbancia: 0-3 U.D.O. (antramicina), 0-2 U.D.O. (el resto). Rango fotométrico: 3 (antramicina), 1 (el resto para $\lambda=300\text{ nm}$) y 0,2 (el resto para $\lambda=300\text{ nm}$)).

fotométricas del DNA, dado que la absorbancia que presenta el antibiótico a 260 nm es mínima, se intentó deshacer el complejo mediante diálisis con MgCl_2 , sal que incluso a bajas concentraciones retarda la formación del complejo (78). No obstante, los datos proporcionados por los espectros probaron que no fue posible tal disociación.

La desnaturalización, sin embargo, se llevó a cabo normalmente, observándose que el máximo de absorción que presenta la antramicina se conserva aún después de la separación de las dos cadenas del DNA. Este hecho está de acuerdo con la información bibliográfica (78) y demuestra que la antramicina continúa unida a las cadenas sencillas después de la desnaturalización (fig. 33).

La unión entre el DNA y el antibiótico, tanto en muestras nativas como desnaturalizadas, persiste también después de recibir diferentes dosis de radiación, apreciándose únicamente una progresiva disminución en la absorbancia característica de la antramicina (figuras 32 y 33). Cabe, por consiguiente, suponer una acción degradante por parte de la radiación sobre el antibiótico, acción que, sin embargo, no afecta a su unión con el DNA.

En los experimentos de ultracentrifugación de muestras de complejo se obtuvieron valores de coeficientes de sedimentación y masas moleculares, magnitudes no registradas hasta ahora en la bibliografía. Estos datos no difieren de los correspondientes al DNA control, por lo que se consideraron válidos los cálculos posteriores de rupturas realizados para las muestras irradiadas considerando como controles los datos anteriores.

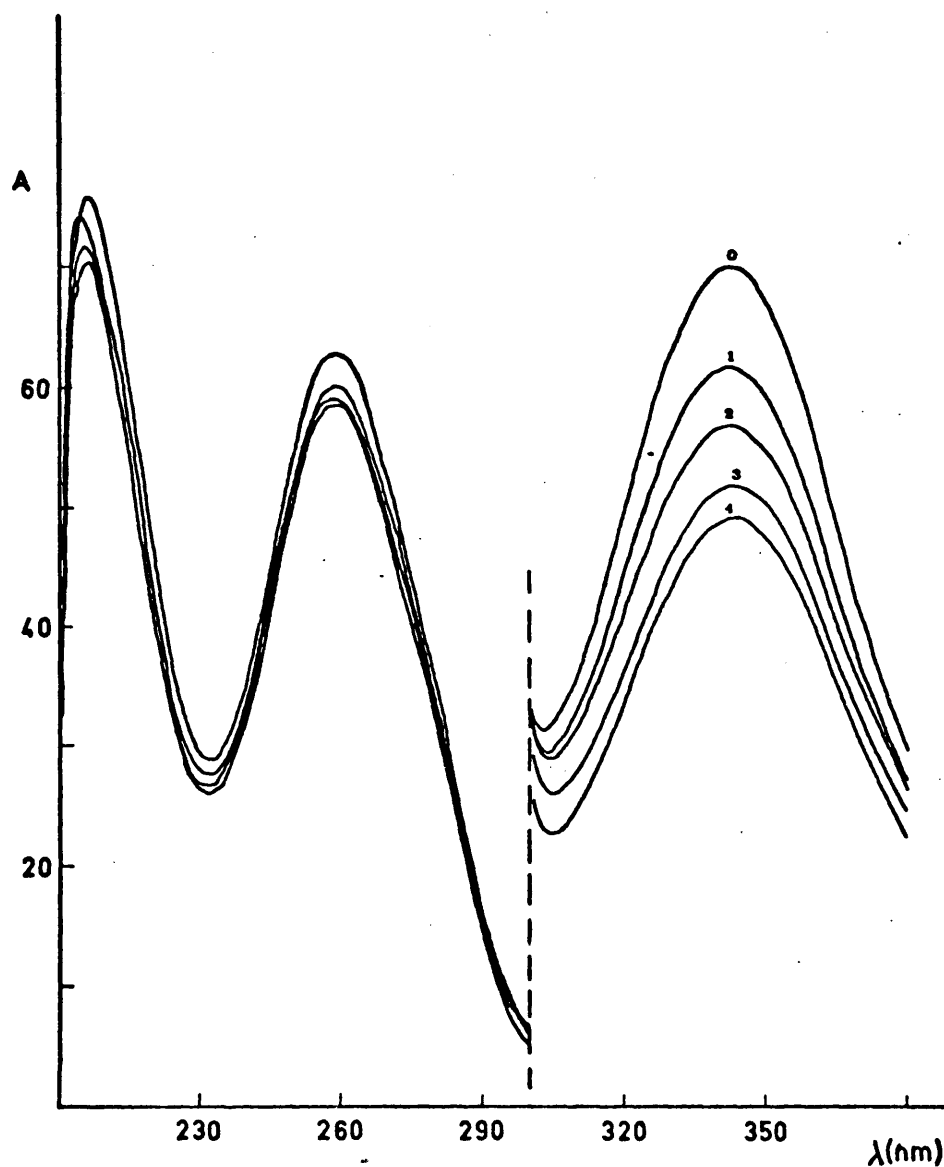


Figura 32.- Efecto de la radiación sobre el espectro del complejo DNA-antramici-
cina (25 $\mu\text{g/ml}$ en DNA y 1,98 mg/ml en antibiótico): 0) Control; 1)
6,09 Krad; 2) 12,18 Krad; 3) 18,27 Krad; 4) 24,36 Krad. Rango de
absorbancia: 0-2 U.D.O. Rango fotométrico: 1 (para $\lambda=300\text{ nm}$) y
0,2 (para $\lambda=300\text{ nm}$).

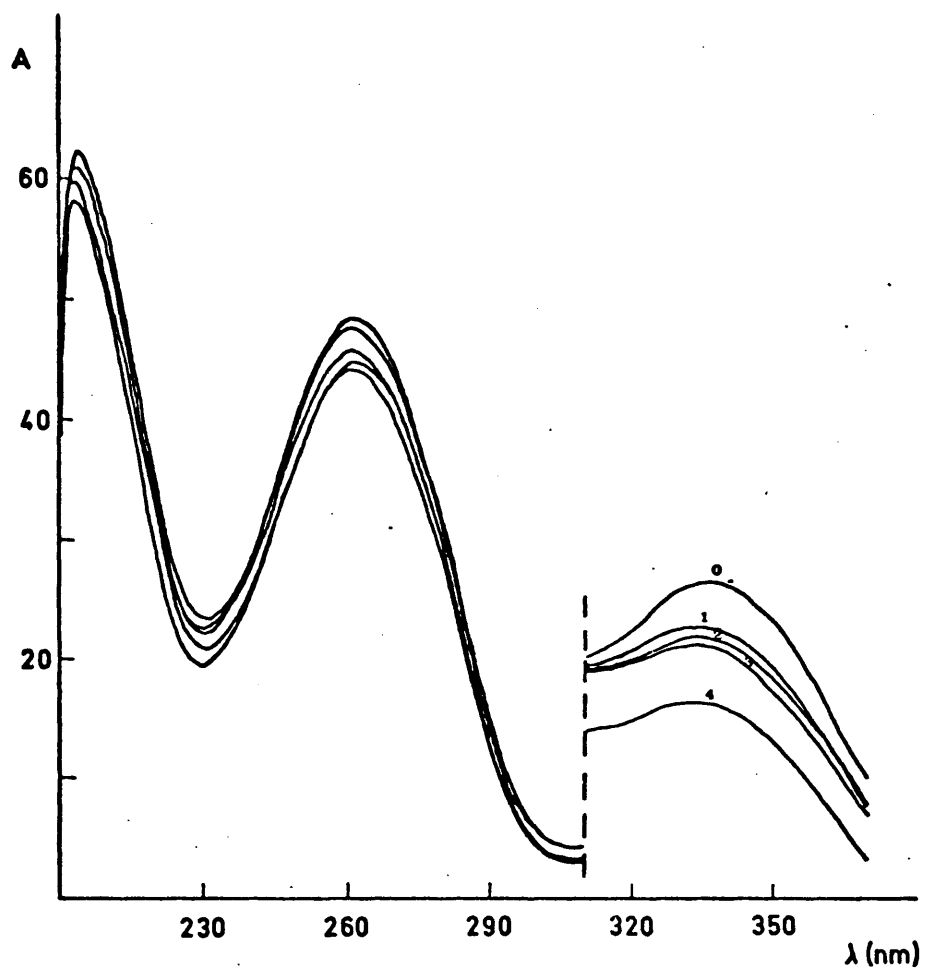


Figura 33.- Efecto de la radiación sobre el espectro del complejo DNA-antramicina después de la desnaturalización (20 $\mu\text{g/ml}$ en DNA y 1,58 mg/ml en antibiótico): 0) Control; 1) 6,09 Krad; 2) 12,18 Krad; 3) 18,27 Krad; 4) 24,36 Krad. Rango fotométrico: 1 (para $\lambda=300$ nm) y 0,2 (para $\lambda=300$ nm).

TABLA XX

Efecto de la antramicina en los datos de sedimentación del DNA nativo

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w (x10^6)$	$M_n (x10^6)$	$B_2 (x10^{-5})$	
				a)	b)
0	$24,1 \pm 0,5$	$11,2 \pm 0,5$	$7,39 \pm 0,26$	-	-
6,09	21,9	8,31	5,91	1,53	2,11
12,18	19,8	6,86	5,02	2,94	3,96
18,27	16,9	4,56	3,23	9,05	10,8
20,30	16,4	4,33	3,02	10,4	12,2
24,36	15,7	3,75	3,72	11,9	14,4
26,39	14,5	3,20	2,17	17,7	20,2
32,48	12,8	2,18	1,40	32,7	35,9
38,57	12,5	2,02	1,28	36,7	40,2

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_2 , frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

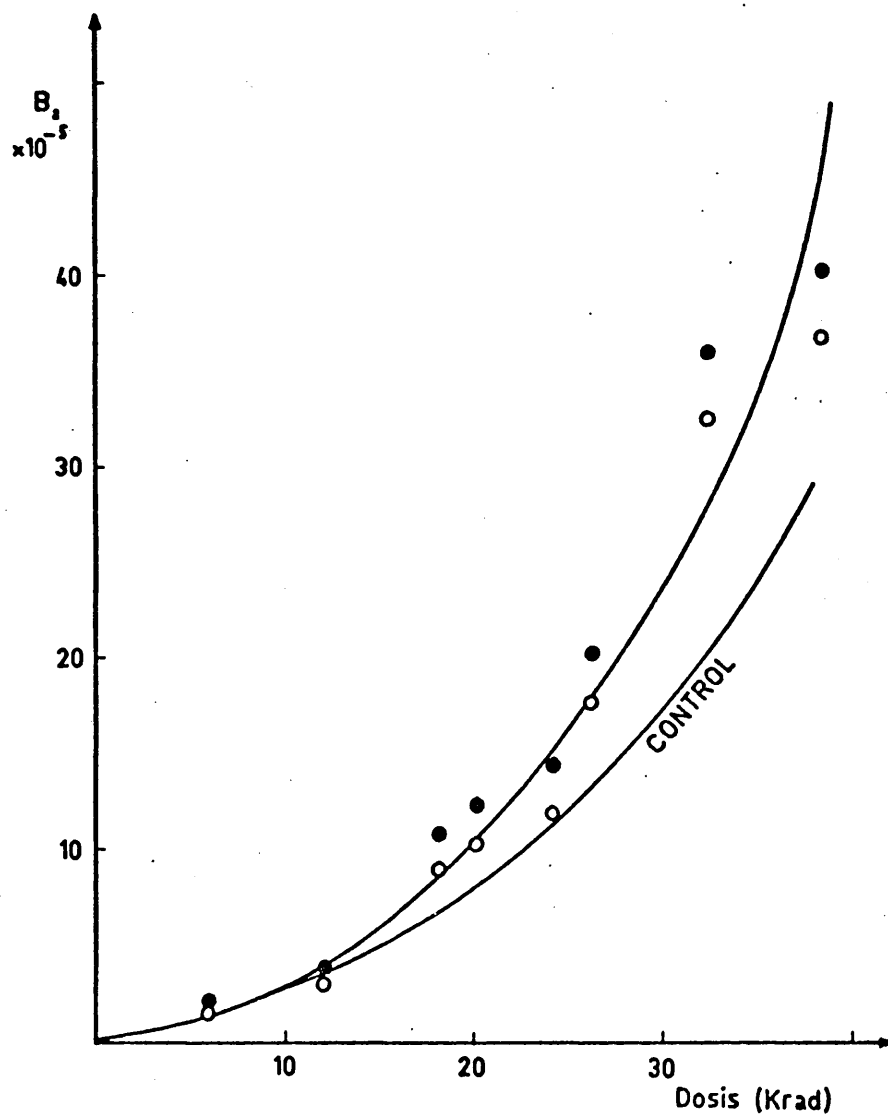


Figura 34.- Efecto de la antramicina en la dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, B_2 (o, valores calculados según la ecuación (1.18); ●, idem, según la ecuación (1.19)).

TABLA XXI

Efecto de la antramicina en los datos de sedimentación del DNA desnaturalizado

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$M_n(x10^6)$	B_1 ($x10^{-3}$) a)	b)
0	$21,0 \pm 0,5$	$4,67 \pm 0,28$	$2,04 \pm 0,16$	-	-
6,09	9,8	0,517	0,324	0,72	0,80
12,18	6,9	0,222	0,132	2,05	2,20
18,27	5,8	0,138	0,0781	3,64	3,82
20,30	5,6	0,133	0,0736	3,91	4,06
24,36	5,1	0,107	0,0549	5,45	5,50
26,39	5,2	0,105	0,0586	4,92	5,14
32,48	4,6	0,0813	0,0402	7,58	7,56
38,57	4,3	0,0683	0,0325	9,53	9,39

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_1 , frecuencia de rupturas simples por nucleótido, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

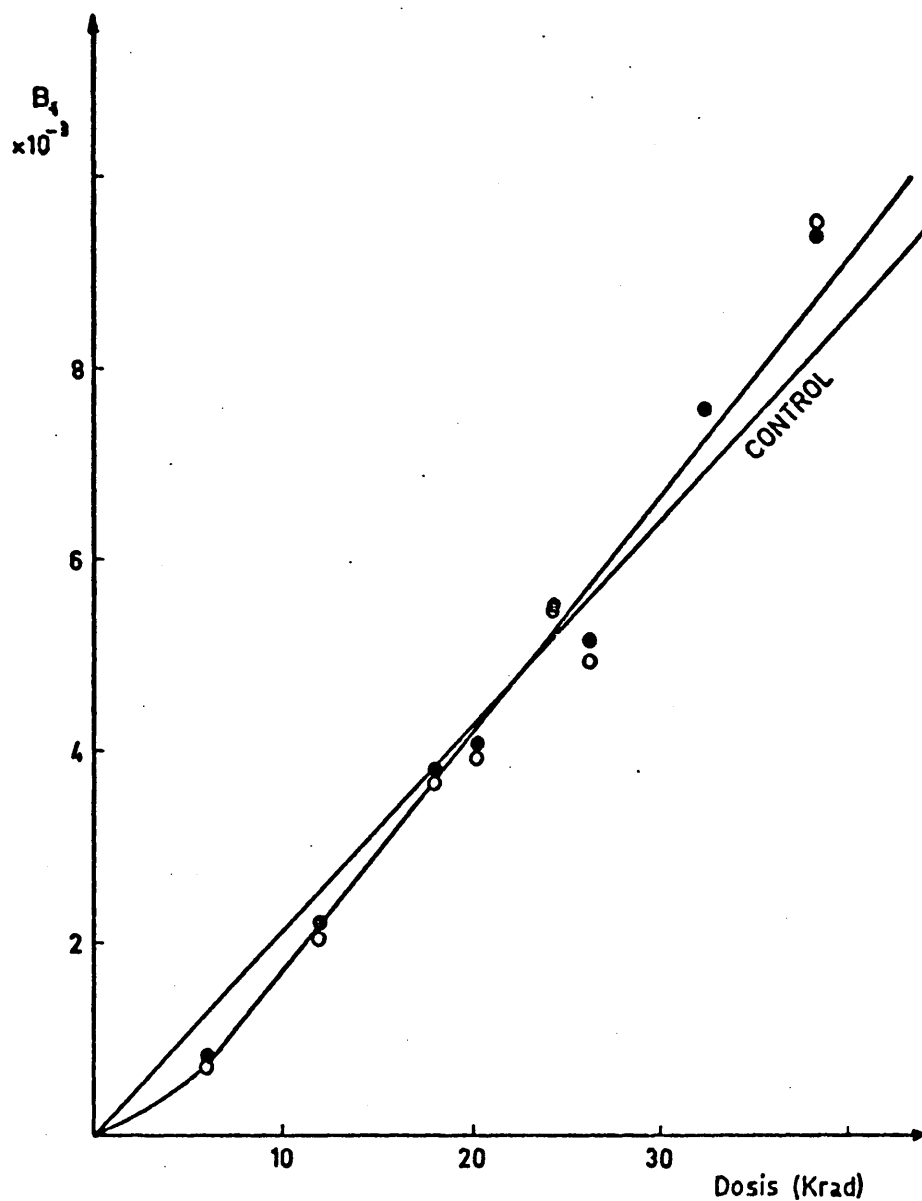


Figura 35.- Efecto de la antramicina en la dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas simples por nucleótido, B_1 (o, valores calculados según la ecuación (1.18); •, idem, según la ecuación (1.19)).

Los valores de sedimentación correspondientes a las muestras irradiadas aparecen en las tablas XX y XXI. Puede observarse que estos datos no difieren ostensiblemente de los correspondientes a DNA irradiado en las mismas condiciones. Consecuencia de ello es que los números de rupturas inducidas, calculados frente a controles del mismo complejo, permiten trazar unas curvas efecto-dosis, tanto para las rupturas dobles como para las sencillas (figuras 34 y 35), que presentan las mismas características que en el caso del DNA irradiado.

Se puede concluir, por tanto, que la antramicina, si bien da lugar a un complejo muy estable con el DNA, no es capaz de modificar notablemente la radiosensibilidad de esta biomolécula.

3.3.4. cis-diclorodiaminplatino (II)

La existencia de un complejo DNA-cis DDP se puso de manifiesto por las variaciones espectrales observadas en la región del máximo y del mínimo del DNA. Los nuevos máximo y mínimo se presentaron, junto con un incremento de absorbancia, a las longitudes de 264 nm y 238 nm (fig. 36), resultado que concuerda con los datos bibliográficos (91).

En cuanto a los resultados de los experimentos de sedimentación, la formación del complejo dió lugar a un incremento muy fuerte en los valores de coeficientes de sedimentación, hecho que resulta difícil de explicar desde las hipótesis que sobre el tipo de unión entre el cis DDP y el DNA se encuentran en la bibliografía (48). Los coeficientes de sedimentación resultan ser tres veces superiores, aproxi-

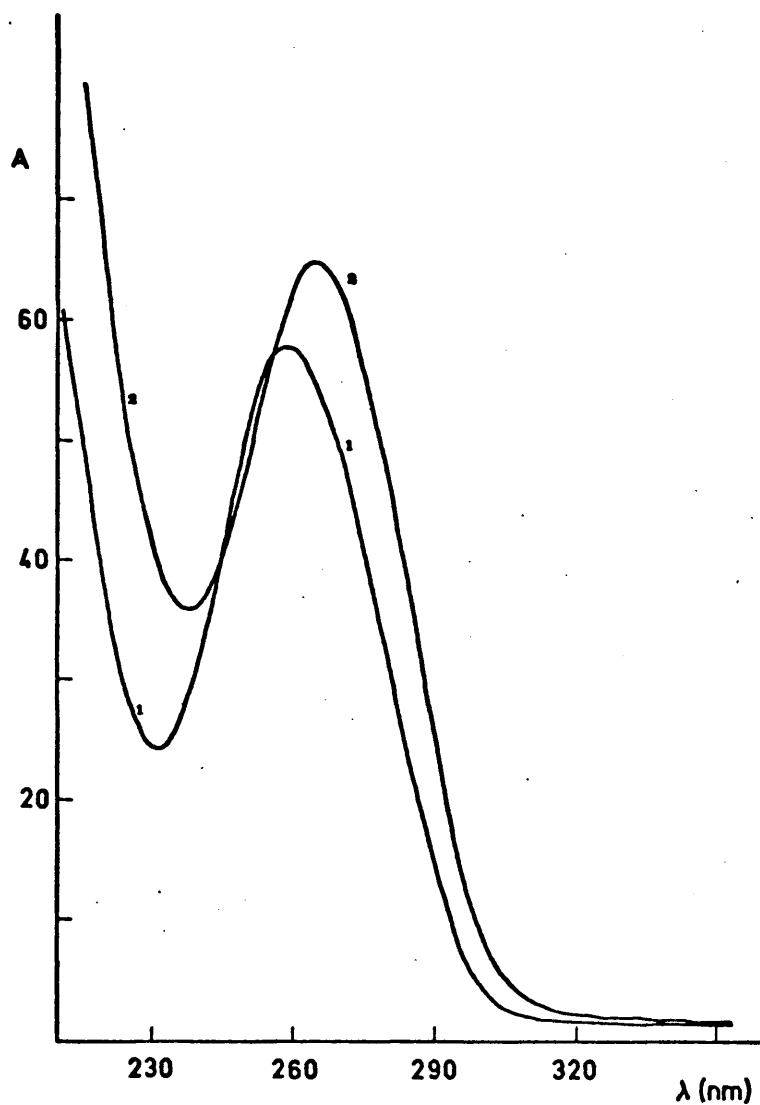


Figura 36.- Espectros comparativos: 1) DNA (25 $\mu\text{g/ml}$); 2) DNA-cis DDP (25 $\mu\text{g/ml}$ en DNA y $4,16 \cdot 10^{-5}$ M en cis-DDP). Rango de absorbancia: 0-2 U.D.O. Rango fotométrico: 1.

madamente, a los valores del DNA control (tabla XXII). Aplicando las ecuaciones de correlación habitualmente empleadas en este trabajo, es to supone masas moleculares de hasta $250 \cdot 10^6$ Dalton, estimación que, no obstante, se ha de admitir con reservas, dado que para ese rango de coeficientes de sedimentación las ecuaciones de correlación no tienen garantizada su validez.

Thomson, en su trabajo de revisión (48), alude a la posibilidad de que existan tres tipos de enlace en la unión entre el DNA y el cis DDP: enlaces dentro de una cadena sencilla, enlaces entre las dos cadenas opuestas del DNA y formación de quelatos dentro de una misma base púrica. Aunque sólo existe confirmación experimental sobre los enlaces del segundo tipo, todo parece indicar que el primero es el más abundante.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sin embargo, apuntan más bien a la posibilidad de formación de enlaces cruzados entre distintas moléculas de DNA para dar lugar a agregados moleculares mayores, puesto que una variación de tal magnitud en el coeficiente de sedimentación sería muy difícil de explicar sólo por cambios con formacionales en la molécula de DNA, teniendo en cuenta además que las condiciones de fuerza iónica fueron las mismas que en otros casos.

Ahora bien, si existen enlaces entre las cadenas opuestas de la doble hélice, logicamente aparecerán problemas en el momento de la desnaturalización. Se procedió a la desnaturalización de las muestras de complejos DNA-cis DDP por el sistema habitual y se observó que los coeficientes de sedimentación continuaban siendo de un orden aná-

TABLA XXII

Efecto del cis-diclorodiaminplatino (II) en los datos de sedimentación del DNA nativo

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$B_2 (x10^{-5})$		C
			a)	b)	
0	70,3	228	74,8	-	8,70
6,09	67,7	199	73,7	0,01	8,55
12,18	64,7	250	71,4	0,07	8,26
18,27	62,3	156	62,2	0,14	7,06

TABLA XXIII

Efecto del cis-diclorodiaminplatino (II) en la sedimentación de DNA que sufrió tratamiento de desnaturalización

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)
0	74,1
6,09	57,1
12,18	49,8
18,27	43,8

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_2 , frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19); C, enlaces cruzados por molécula).

logo al de las muestras nativas (tabla XXIII), hecho que induce a pensar que existen enlaces entre las cadenas opuestas de una misma molécula, además de los enlaces cruzados entre distintas moléculas. Los cálculos que se realizaron en este sentido dieron un valor de 7-9 enlaces cruzados por molécula (tabla XXII).

Todos estos problemas, y la escasa posibilidad de resolverlos con las técnicas utilizadas en el presente trabajo hicieron que no se profundizara en el estudio de la acción de la radiación sobre el complejo DNA-cis DDP. Se suministraron entonces sólo tres dosis, las cuales dieron indicios de producir cierto efecto degradante (tabla XXII). Por otra parte, el efecto de la radiación se mostró más acusado sobre las muestras que después se sometieron al tratamiento de la desnaturalización (tabla XXIII), lo que se puede interpretar como una consecuencia de la existencia de zonas más o menos extensas en las que la separación de cadenas es más factible.

En términos generales se puede decir, por tanto, que debido a la formación de estos complejos fuertes e irreversibles con el cis DDP, el DNA no podría proseguir correctamente su actividad en la célula viva. El efecto de la irradiación sería entonces despreciable, pues el daño biológico mayor provendría de la propia interacción entre el DNA y el cis DDP.

3.3.5. Mitomicina C

En las lecturas espectrofotométricas se pudo observar (fig. 37) que la molécula de mitomicina C presenta un máximo de absorción importante a 363 nm, otro a 218 nm y una concavidad en la región de 260 nm con ab-

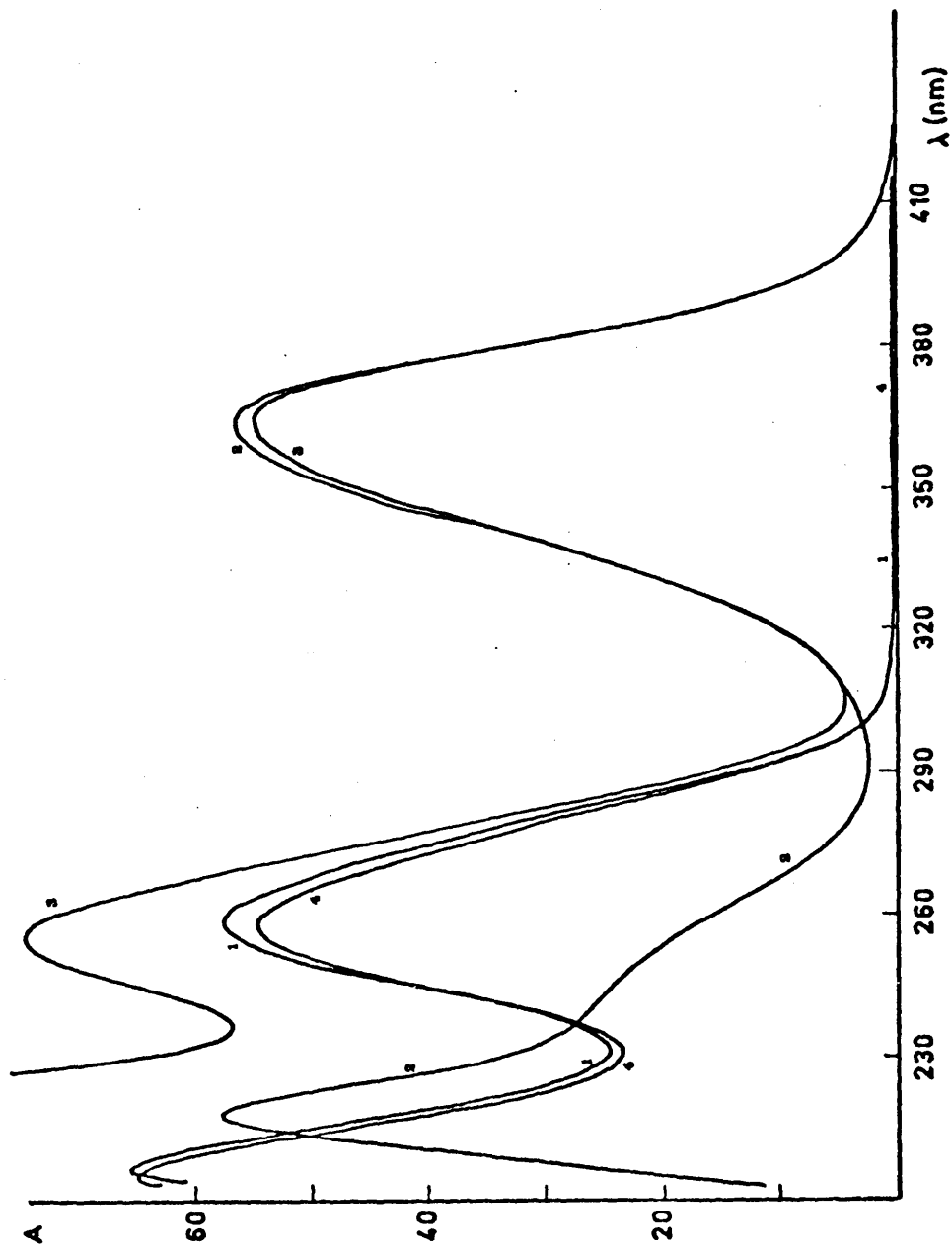


Figura 37.- Espectros comparativos: 1) DNA ($25 \mu\text{g/ml}$); 2) mitomicina C ($1,25 \cdot 10^{-2} \text{ mg/ml}$); 3) DNA + mitomicina C ($25 \mu\text{g/ml}$ en DNA y $1,25 \cdot 10^{-2} \text{ mg/ml}$ en antibiótico); 4) Idem después de diálisis. Rango de absorbancia: 0-2 U.D.O. Rango fotométrico: 1.

sorbancia ligeramente menor a la tercera parte de la medida en los máximos. Los espectros característicos de las mezclas de DNA y mitomicina C proporcionan curvas bien distintas de las de sus componentes, a consecuencia de la aditividad de absorbancias. Así, el máximo de 260 nm está algo incrementado y ligeramente desplazado a 255 nm, el mínimo de 230 nm se encuentra muy incrementado y desplazado a 236 nm, mientras que, por el contrario, y como cabía esperar, el máximo del antibiótico a 363 nm permanece inalterado.

Con objeto de eliminar el antibiótico de las mezclas, se efectuaron diálisis frente al disolvente común de trabajo antes de los experimentos de ultracentrifugación. Estas diálisis consiguieron recuperar en las muestras el espectro característico del DNA. De este modo, las determinaciones de velocidad de sedimentación correspondieron a DNA, y todo efecto de radiación que se observara, diferente del obtenido en los estudios de radiosensibilidad del DNA sería consecuencia de la presencia del antibiótico en el momento de la irradiación.

En las tablas XXIV y XXV aparecen los resultados de la sedimentación de las muestras irradiadas, así como los correspondientes a una media de controles no irradiados que habían sufrido el mismo tratamiento. Puede observarse que los coeficientes de sedimentación y las masas moleculares son superiores a los inducidos por iguales dosis de rayos X en soluciones de DNA. En las figuras 38 y 39 se representan los valores de rupturas dobles y sencillas frente a sus dosis correspondientes. Estos datos se calcularon en relación a los controles ya mencionados, observándose como en casos anteriores ligeras discrepancias se

TABLA XXIV

Efecto de la mitomicina C en los datos de sedimentación del DNA nativo

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$M_n(x10^6)$	$B_2 (x10^{-5})$	
				a)	b)
0	$25,4 \pm 0,3$	$13,1 \pm 0,5$	$7,14 \pm 0,29$	-	-
6,09	24,0	10,9	7,32	0	0
12,18	21,9	8,49	5,88	0,905	1,89
18,27	21,2	7,77	5,57	1,10	2,45
24,36	19,9	6,62	4,63	3,18	4,70
30,45	19,9	6,85	5,07	1,86	3,55
36,54	18,5	5,69	4,17	4,14	6,18
42,63	17,2	4,80	3,52	6,43	8,91
48,72	15,3	3,55	2,35	15,2	17,7

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_2 , frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

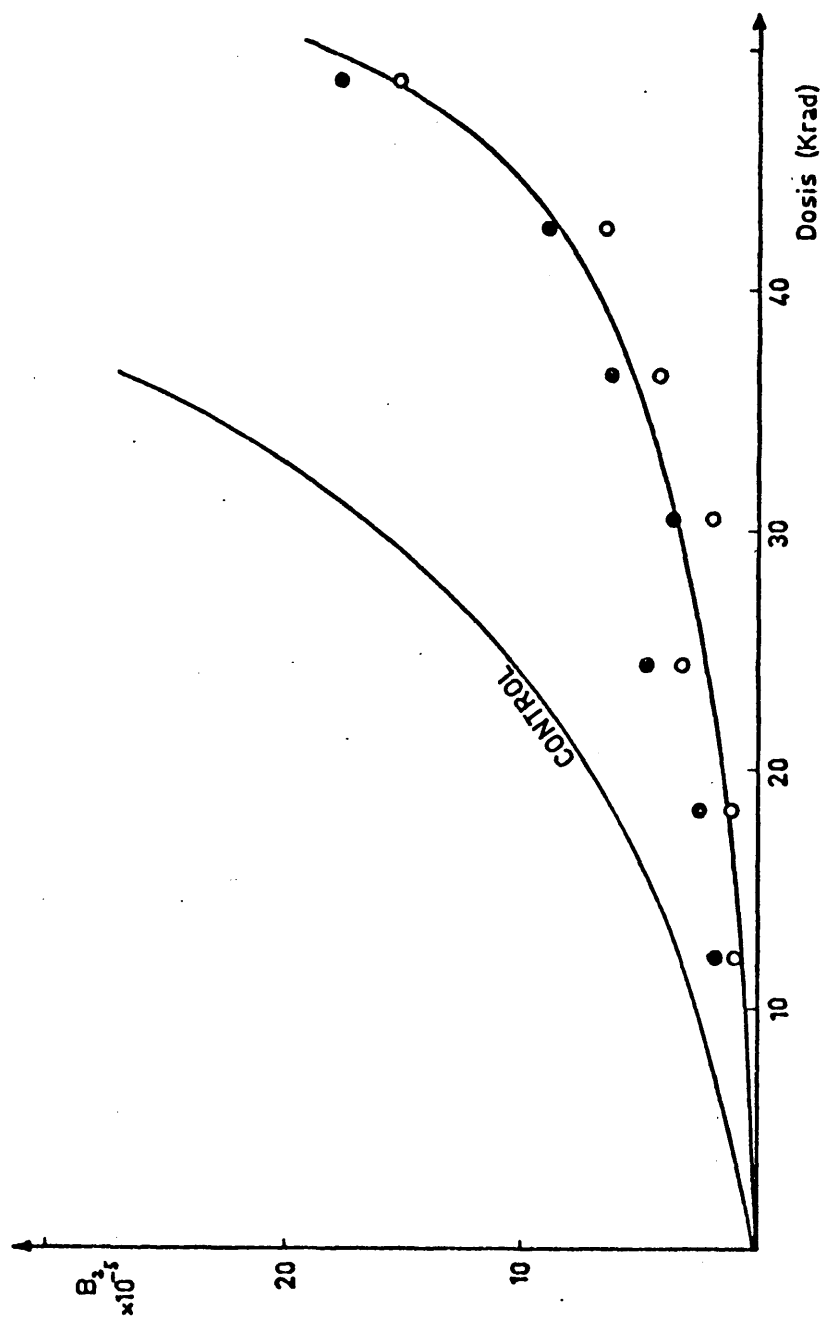


Figura 38.- Efecto de la mitomicina C en la dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, B_2 . (o, valores calculados según la ecuación (1.18); •, ídem, según la ecuación (1.19)).

TABLA XXV

Efecto de la mitomicina C en los datos de sedimentación del DNA desnaturalizado

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$M_n(x10^6)$	$B_1 (x10^{-3})$	
				a)	b)
0	$18,6 \pm 0,9$	$3,84 \pm 0,35$	$1,79 \pm 0,24$	-	-
6,09	11,7	1,03	0,583	0,33	0,36
12,18	10,07	0,650	0,387	0,57	0,63
18,27	8,8	0,471	0,275	0,88	0,95
24,36	8,1	0,361	0,221	1,12	1,23
30,45	7,3	0,308	0,192	1,31	1,45
36,54	7,0	0,246	0,154	1,66	1,83
42,63	6,0	0,176	0,0996	2,80	2,94
48,72	5,5	0,127	0,0779	3,51	3,81

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_1 , frecuencia de rupturas simples por nucleótido, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

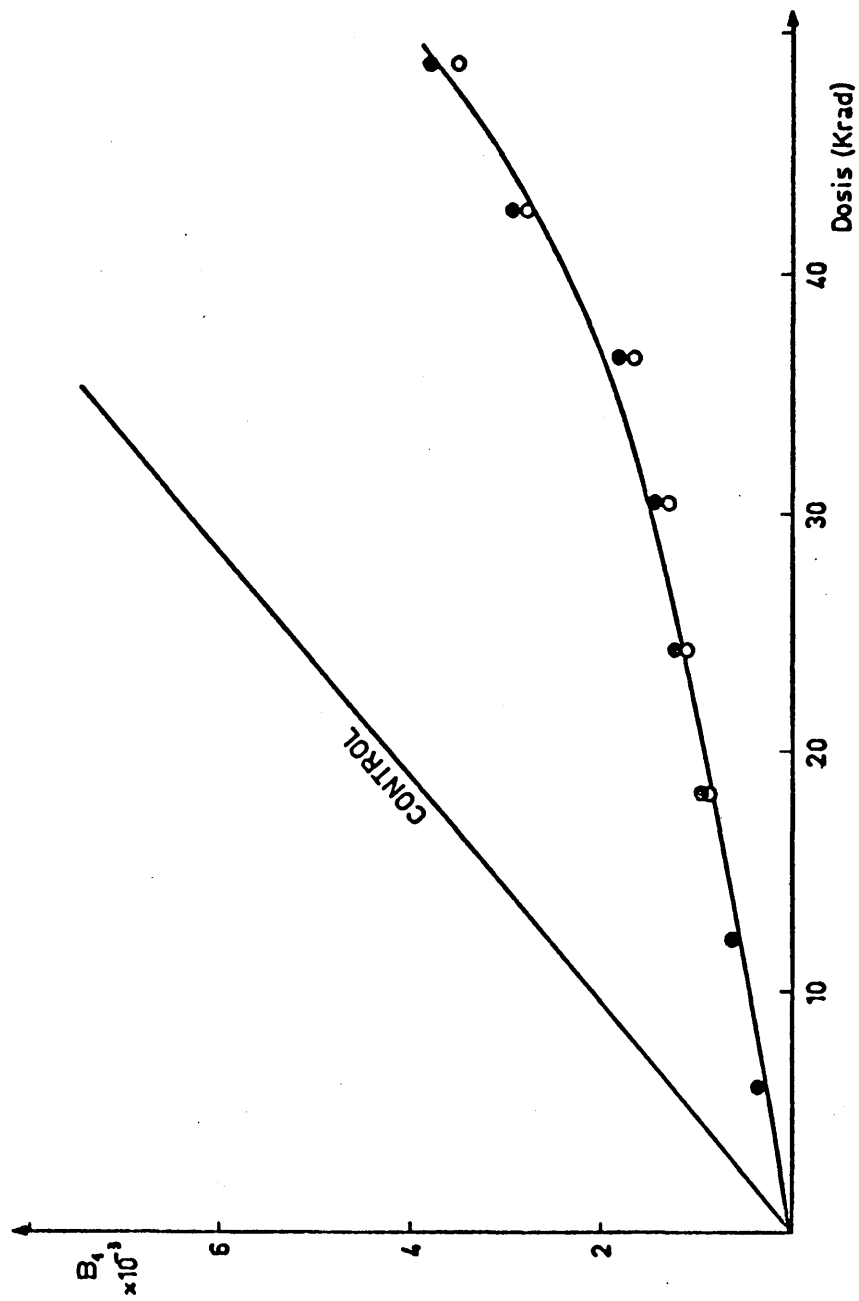


Figura 39.- Efecto de la mitomicina C en la dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas simples por nucleótido, B_1 (o), valores calculados según la ecuación (1.18); •, idem, según la ecuación (1.19)).

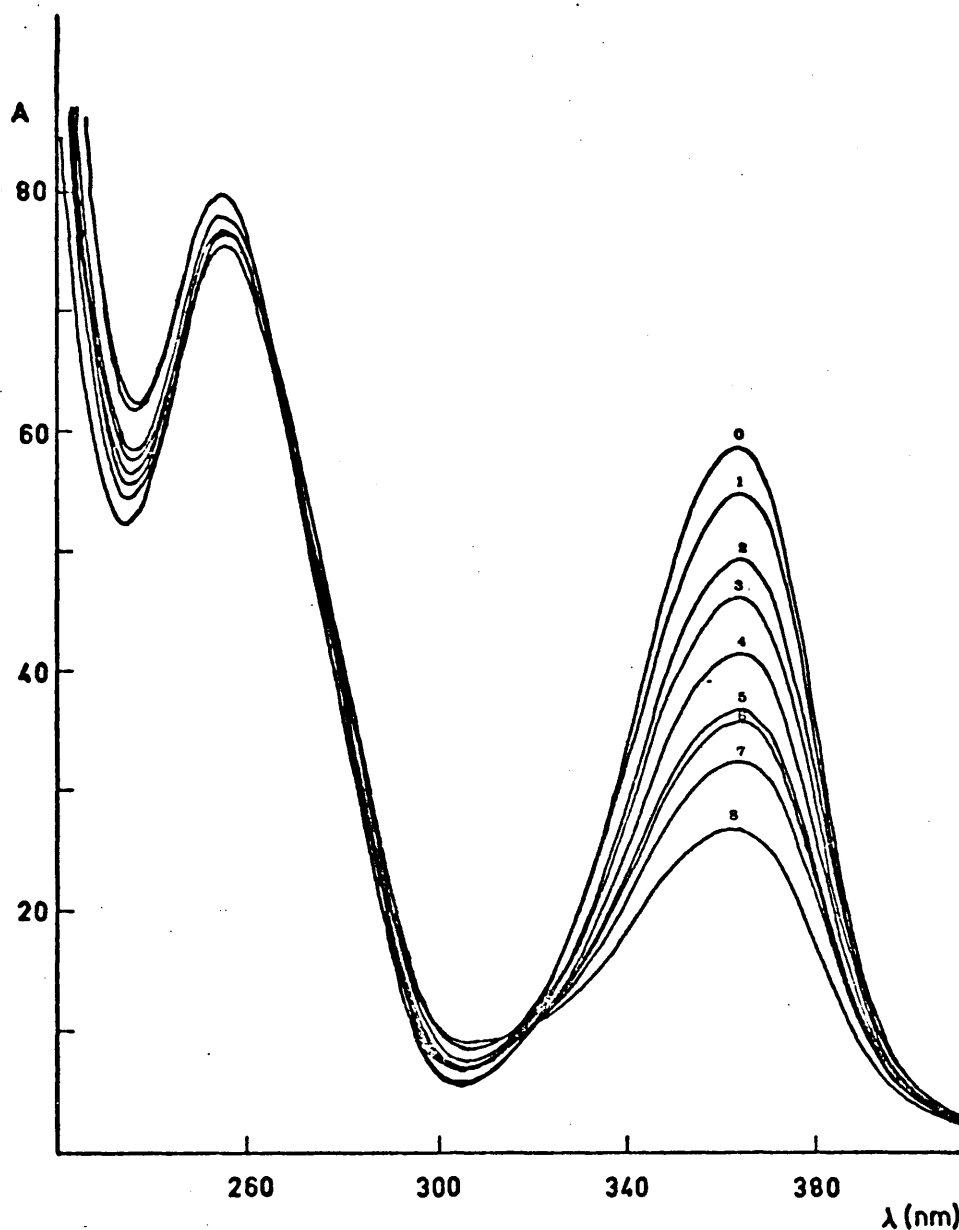


Figura 40.- Efecto de la radiación sobre el espectro de la mezcla DNA + mitomina C (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en DNA y $1,25 \cdot 10^{-2}$ mg/ml en antibiótico): 0) Control; 1) 6,09 Krad; 2) 12,18 Krad; 3) 18,27 Krad; 4) 24,36 Krad; 5) 30,45 Krad; 6) 36,54 Krad; 7) 42,63 Krad; 8) 48,72 Krad. Rango de absorbancia: 0-2 U.D.O. Rango fotométrico: 1.

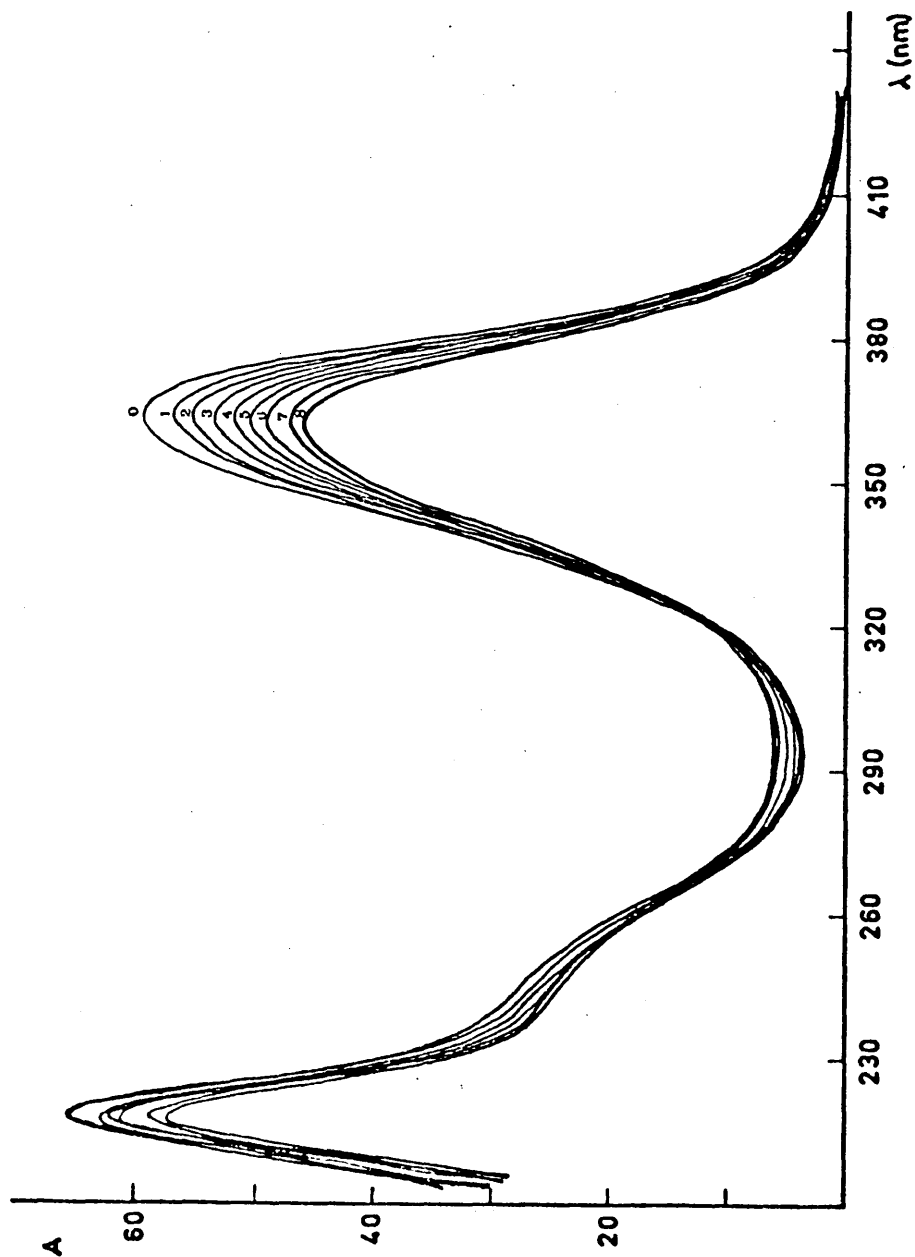


Figura 41.- Efecto de la radiación sobre el espectro de la mitomicina C ($1,25 \cdot 10^{-2}$ mg/ml): 0) Control; 1) 6,09 Krad; 2) 12,18 Krad; 3) 18,27 Krad; 4) 24,36 Krad; 5) 30,45 Krad; 6) 36,54 Krad; 7) 42,63 Krad; 8) 48,72 Krad.
Rango de absorbancia: 0-2 U.D.O. Rango fotométrico: 1.

TABLA XXVI

Estudio espectrofotométrico de la degradación de la mitomicina C, irradiada en presencia y ausencia de DNA

Dosis (Krad)	A_{364} (U.D.O.)		ΔA_{364} (%)	
	Mitom. + DNA	Mitom.	Mitom. + DNA	Mitom.
0	0,583	0,587	-	-
6,09	0,546	0,564	- 6,35	- 3,92
12,18	0,494	0,550	- 15,27	- 6,30
18,27	0,465	0,532	- 20,24	- 9,37
24,36	0,420	0,516	- 27,96	- 12,10
30,45	0,372	0,502	- 36,19	- 14,48
36,54	0,362	0,487	- 37,91	- 17,04
42,63	0,328	0,470	- 43,74	- 19,93
48,72	0,272	0,458	- 53,34	- 21,98

- 178 -

gún la fórmula utilizada. De todos modos, puede apreciarse que estas gráficas se encuentran por debajo de las correspondientes a DNA irradiado, de donde se deduce que el antibiótico ejerce una acción protectora en la degradación del DNA por la radiación.

Por otra parte, en el estudio espectrofotométrico realizado sobre muestras irradiadas sin dializar (figuras 40 y 41) se observa que el máximo correspondiente a la mitomicina C decrece con las dosis crecientes de radiación, y que esta disminución es aún mayor que la aparecida en las disoluciones de mitomicina C irradiadas (tabla XXVI), lo que revela que la degradación del antibiótico es mayor si el DNA está presente en la disolución.

Ambos efectos inducen a pensar que existe una competencia entre ambas moléculas por los radicales producidos como consecuencia de la irradiación. Igualmente, la presencia de DNA puede ejercer una acción estabilizadora que alargue la vida media de los radicales, con lo que la molécula de mitomicina C, más sensible a la radiación que el DNA, resulta más intensamente dañada en presencia de éste que cuando se encuentra sola, explicándose de este modo la acción protectora del antibiótico respecto del DNA.

3.3.6. Cloroquina

Entre las distintas bandas de absorción que presenta la cloroquina en el U.V., correspondientes a las longitudes de onda de 237, 257, 330 y 343 nm, se estudió esta última en relación con la unión en-

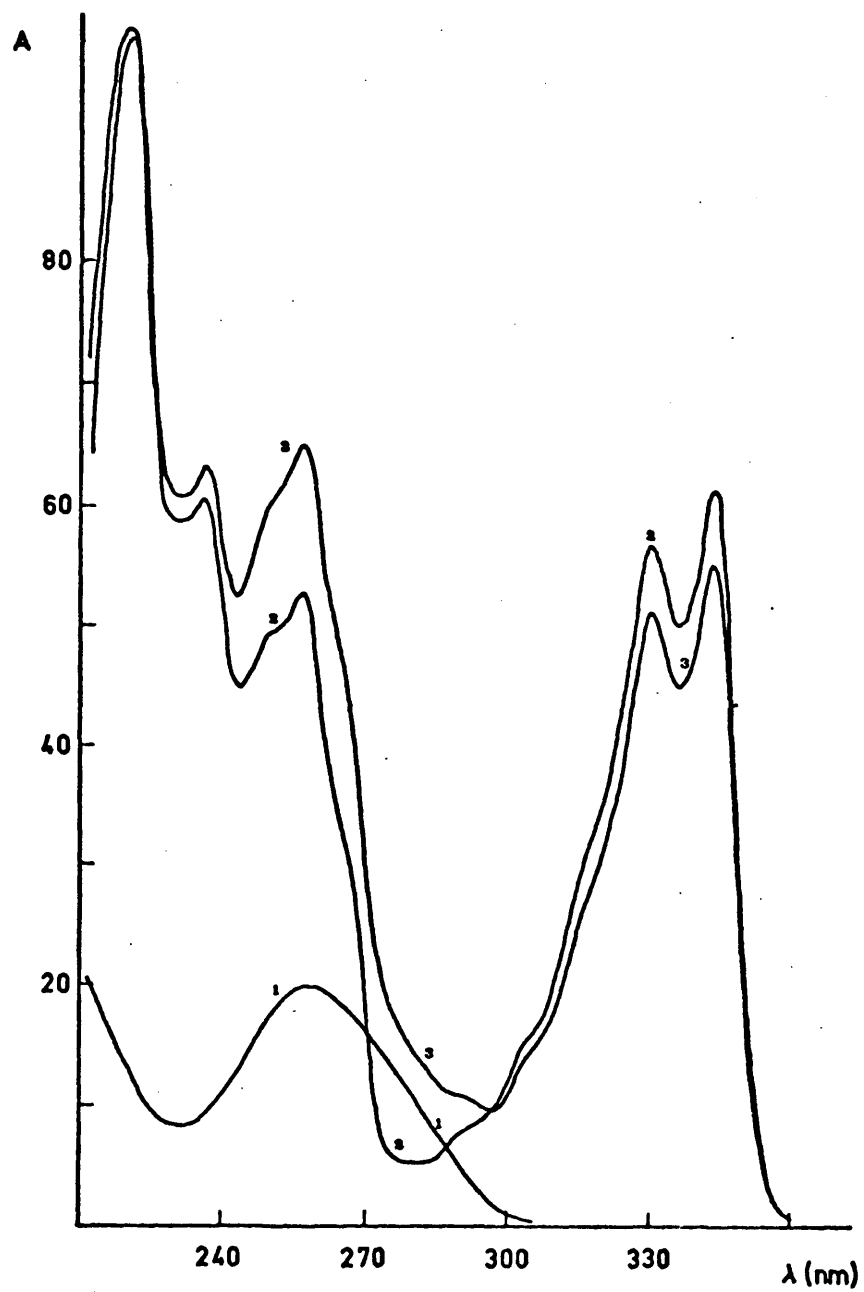


Figura 42.- Espectros comparativos de: 1) DNA (25 $\mu\text{g/ml}$); 2) Cloroquina ($5 \cdot 10^{-5}$ M); 3) DNA-cloroquina (25 $\mu\text{g/ml}$ en DNA y $5 \cdot 10^{-5}$ M en cloroquina). Rango de absorbancia: 0-3 U.D.O. Rango fotométrico: 1.

tre la droga y el DNA. La mezcla de las disoluciones de DNA y cloroquina dió lugar a un ligero desplazamiento (de 4 a 8 nm) en la banda referida, junto con un descenso de absorbancia (fig. 42), datos que, según la bibliografía, confirman la formación del complejo (107).

Por otra parte, los máximos de la cloroquina correspondientes a 257 y 237 nm, al coincidir con regiones de absorbancia del DNA plantearon el problema de su interferencia óptica en el curso de la centrifugación. Por este motivo, y prescindiendo de que las absorbancias pudieran ser simplemente aditivas, se prefirió eliminar la cloroquina del complejo antes de proceder a la sedimentación de las muestras. Este objetivo se consiguió plenamente mediante diálisis con $MgCl_2$, en períodos de tiempo no muy largos (inferiores a 48 horas), demostrándose la disociación del complejo y posterior eliminación de la cloroquina al observar la total desaparición del máximo que ésta presenta a 343 nm y la perfecta recuperación del espectro característico del DNA en la zona de 260 y 230 nm.

No obstante, antes de efectuar las diálisis se hicieron pruebas espectrofotométricas para las muestras irradiadas, con objeto de estudiar la influencia de la radiación sobre el complejo. Como puede observarse en la fig. 43, no se detectaron cambios apreciables en ninguna zona del espectro, conservándose las bandas con intensidades semejantes.

Los datos de sedimentación de las muestras irradiadas, correspondientes, por consiguiente, a DNA que en el momento de la irradiación se encontraba en forma de complejo con la cloroquina, manifiestan la

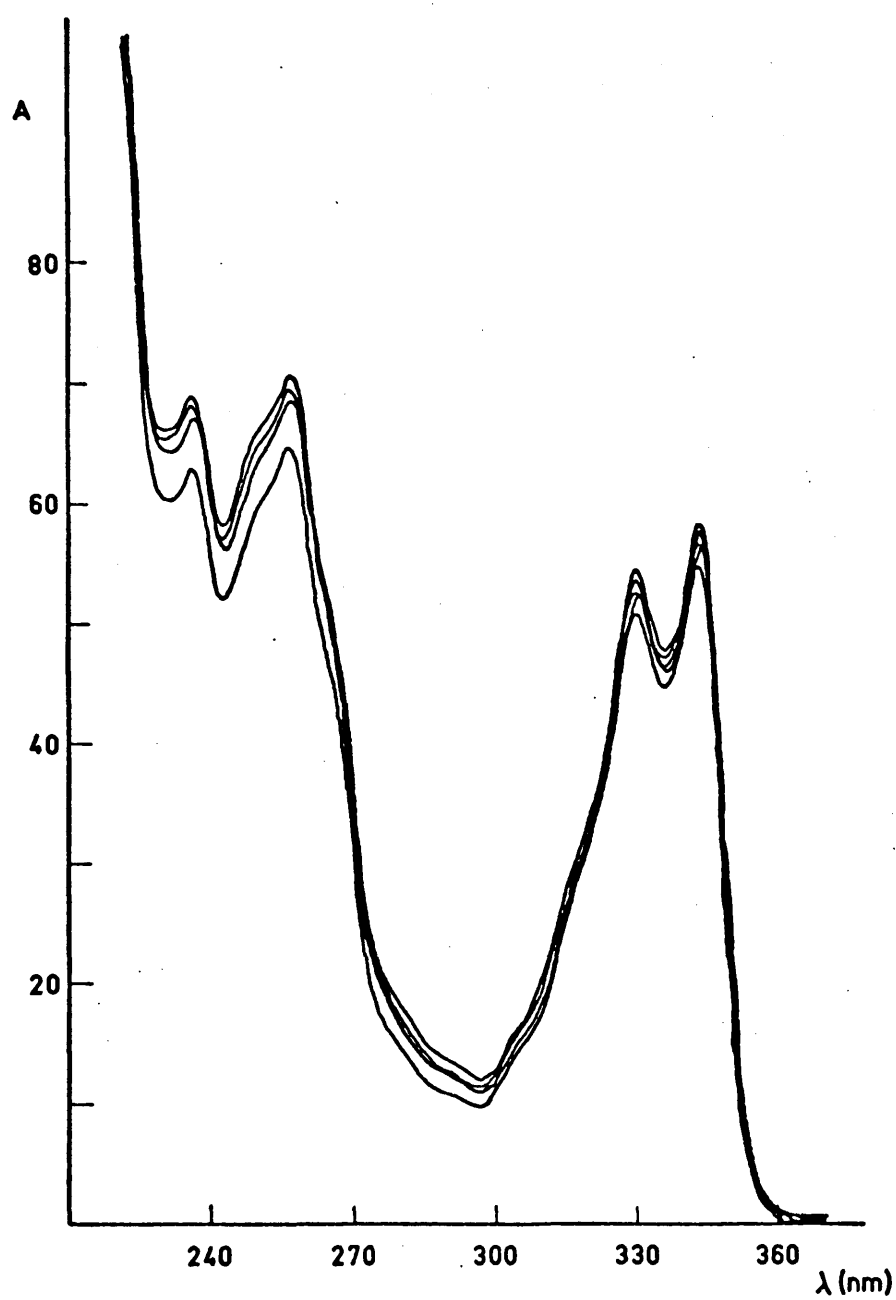


Figura 43.- Efecto de la radiación sobre el espectro del complejo DNA-cloroquina (25 $\mu\text{g/ml}$ en DNA y $5 \cdot 10^{-5}$ M en cloroquina). Rango de absorbancia: 0-3 U.D.O. Rango fotométrico: 3.

TABLA XXVII

Efecto de la cloroquina en los datos de sedimentación del DNA nativo

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$M_n(x10^6)$	$B_2 (x10^{-5})$	
				a)	b)
0	$24,6 \pm 0,4$	$13,6 \pm 1,8$	$7,40 \pm 1,84$	-	-
11,16	19,9	6,50	5,13	1,64	3,72
12,18	20,4	7,22	5,13	2,25	3,70
18,27	20,6	7,68	5,10	2,69	3,78
21,31	21,5	7,93	5,74	1,06	2,42
27,40	20,7	7,49	5,19	2,29	3,58
30,45	18,9	6,14	4,26	4,57	6,20
33,5	16,6	4,23	3,33	6,95	10,3
39,58	15,3	3,42	2,64	11,1	15,1
45,67	14,6	3,01	2,26	14,7	19,0

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_2 , frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

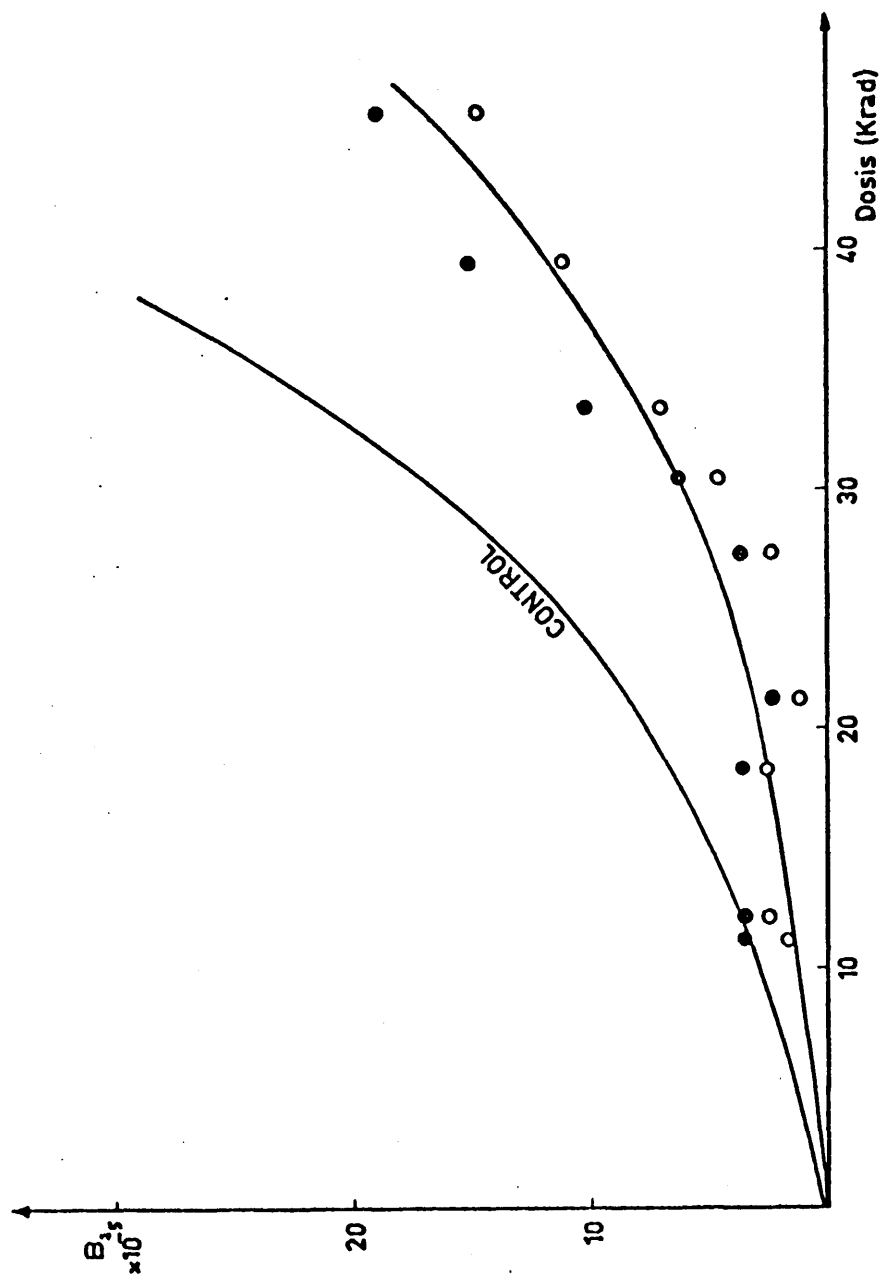


Figura 44.- Efecto de la cloroquina en la dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas dobles por nucleótido par, B_2 (o, valores calculados según la ecuación (1.18); •, idem, según la ecuación (1.19)).

TABLA XXVIII

Efecto de la cloroquina en los datos de sedimentación del DNA desnaturalizado

Dosis (Krad)	$s_{20,w}$ (S)	$M_w(x10^6)$	$M_n(x10^6)$	$B_1 (x10^{-3})$	
				a)	b)
0	$19,7 \pm 0,5$	$4,05 \pm 0,85$	$1,90 \pm 0,05$	-	-
9,13	9,81	0,552	0,405	0,48	0,60
11,16	8,0	0,348	0,255	0,86	1,05
12,18	8,9	0,469	0,303	0,76	0,86
15,22	8,5	0,378	0,267	0,83	0,99
18,27	8,2	0,382	0,226	1,12	1,21
21,31	7,5	0,297	0,227	0,96	1,20
27,40	6,5	0,199	0,144	1,67	2,00
30,45	6,5	0,219	0,121	2,32	2,41
33,50	5,5	0,145	0,0927	2,87	3,18
39,58	5,2	0,0991	0,0672	3,90	4,45
45,67	4,6	0,0773	0,0460	6,14	6,57

($s_{20,w}$, coeficiente de sedimentación medio; M_w , masa molecular promedio en peso; M_n , masa molecular promedio en número; B_1 , frecuencia de rupturas simples por nucleótido, calculadas: a) según la ecuación (1.18), b) según la ecuación (1.19)).

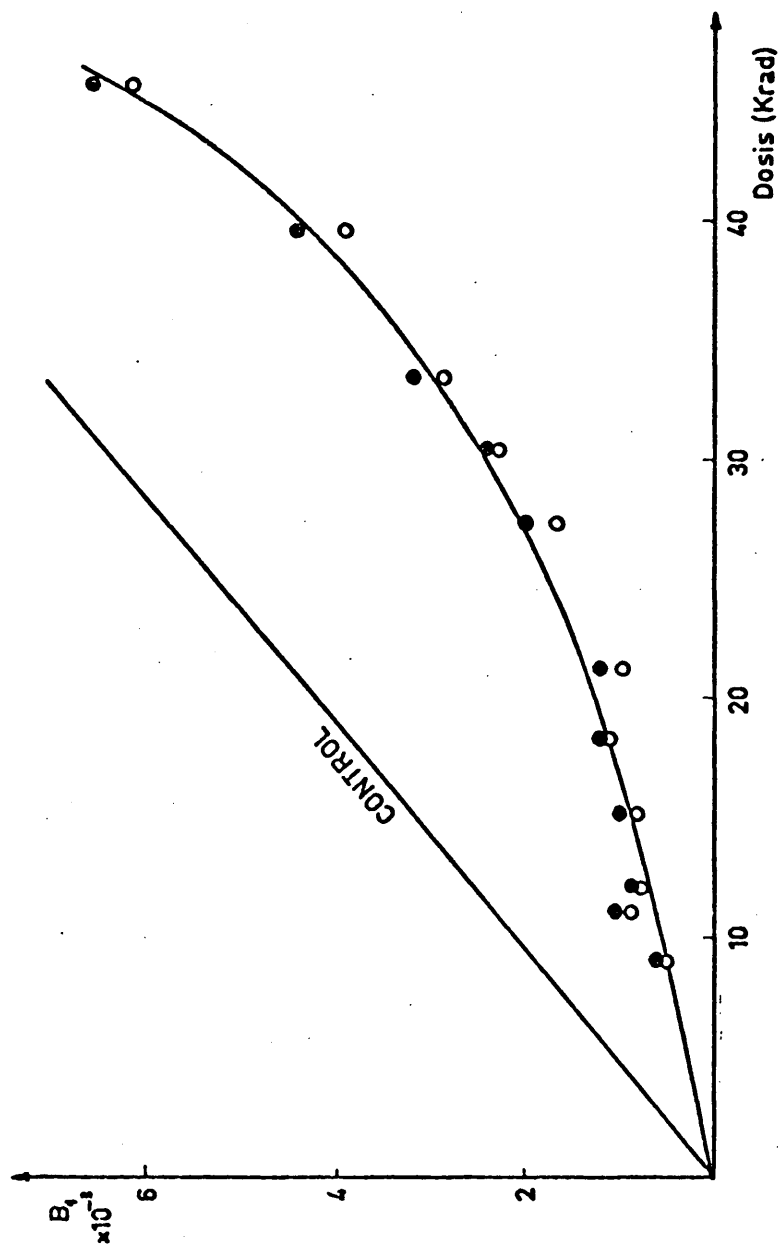


Figura 45.- Efecto de la cloroquina en la dependencia con la dosis de la frecuencia de rupturas simples por nucleótido, B_1 (o , valores calculados según la ecuación (1.18); • , idem, según la ecuación (1.19)).

acción degradante de la radiación, tanto para el caso de muestras nativas como desnaturalizadas (tablas XXVII y XXVIII). No obstante, la disminución de los coeficientes de sedimentación y masas moleculares no es tan intensa como la que se observa cuando se irradian dosis iguales sobre disoluciones análogas de DNA. Traducido ésto a valores de rupturas dobles y sencillas, calculadas frente a controles que sufrieron el mismo proceso de diálisis, se obtuvieron unas curvas efecto-dosis que se hallan por debajo de las correspondientes al DNA irradiado (figuras 44 y 45).

Se puede concluir, por tanto, que la cloroquina, una vez que forma complejo con el DNA, actúa en relación con esta biomolécula con propiedades radioprotectoras.

IV. CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizó un DNA que se extrajo de timo de ternera.

Se procedió en primer lugar a la caracterización de su masa molecular, obteniéndose para el DNA nativo unas masas moleculares promedio en peso y promedio en número de:

$$M_w = 25,8 \cdot 10^6 \text{ Dalton} \quad M_n = 9,46 \cdot 10^6 \text{ Dalton}$$

valores que indican un grado de polimerización similar al encontrado en otros trabajos para este tipo de DNA.

Para el DNA desnaturalizado, los valores obtenidos en esta caracterización fueron :

$$M_w = 3,78 \cdot 10^6 \text{ Dalton} \quad M_n = 2,09 \cdot 10^6 \text{ Dalton}$$

A continuación se estudió la radiosensibilidad de este DNA, evaluando las rupturas simples y dobles que la radiación induce sobre las cadenas de la biomolécula. Dada la escasa trascendencia de los efectos de concentración observados en la caracterización, se hizo aquí un estudio de la repercusión de este efecto sobre los valores de rupturas calculados, con objeto de fijar las condiciones de trabajo definitivas en el momento de la centrifugación. Con este fin, se hicieron los cálculos pertinentes a partir de concentraciones distintas de DNA nativo, correspondiente a una muestra que fue irradiada previamente a una dosis determinada. Se llegó a la conclusión de que era innecesario efectuar experimentos de sedimentación a concentraciones distintas, calculándose al mismo tiempo los valores "umbral" de rupturas dobles, a partir de los cuales éstas se podían considerar como significativas, y no como mera consecuencia de efectos de concentración. Estos cálculos dieron como límite máximo

un valor de $1,04 \cdot 10^{-5}$ rupturas dobles/nucleótido par.

Ya en los experimentos de radiosensibilidad propiamente dichos, efectuados irradiando el DNA con diferentes dosis, incluidas en un rango comprendido entre 4 y 50 Krad, se obtuvo un conjunto de números de rupturas que se ajustaron a las siguientes expresiones:

$$B_2 = 2,4 \cdot 10^{-13} D^2$$

para las rupturas dobles, y:

$$B_1 = 2,0 \cdot 10^{-7} D$$

para las rupturas sencillas.

Las curvas efecto-dosis así obtenidas fueron utilizadas posteriormente como referencia para calibrar las posibles modificaciones que los compuestos estudiados indujeran en los valores de rupturas del DNA.

Los compuestos ensayados como modificadores fueron: daunomicina, cromomicina A_3 , antramicina, cis-diclorodiaminplatino (II), mitomicina C y cloroquina.

Excepto en el caso de la mitomicina C, antibiótico que solamente se mezcló con el DNA, antes de la irradiación se procedió a la formación de un complejo entre cada uno de los productos mencionados y el DNA, hecho que se comprobó estudiando las alteraciones aparecidas en el espectro característico del producto, del DNA o de ambos conjuntamente.

Una vez efectuadas las irradiaciones, y antes de realizar los experimentos de sedimentación de las muestras de DNA nativo para

calcular las rupturas dobles, se procedió o no, según las características de cada complejo, a su disociación mediante diálisis adecuadas. No obstante, se reservaron siempre alícuotas de todas las muestras de complejo sin disociar, con la doble finalidad de efectuar estudios espectrofotométricos sobre su radiosensibilidad, y de someterlas al proceso de desnaturalización necesario para poder calcular las rupturas simples por sedimentación. El cálculo de rupturas dobles y sencillas se hizo, en todos los casos, comparando las masas moleculares de las muestras irradiadas con las correspondientes a controles que sufrieron idénticos tratamientos.

Las representaciones gráficas de frecuencias de rupturas frente a dosis de radiación permitieron deducir, por comparación con la correspondiente gráfica de DNA irradiado, el comportamiento radiosensibilizante o radioprotector de cada uno de los productos ensayados, estudio del que se obtuvieron las siguientes conclusiones:

I) El antibiótico daunomicina, capaz de formar complejos con el DNA mediante interacciones mixtas de tipo electrostático, puentes de hidrógeno e intercalación entre los pares de bases, manifiesta una notable resistencia a la acción degradante de la radiación, comportándose además como un poderoso agente radiosensibilizador respecto a rupturas dobles y sencillas inducidas en el DNA.

II) La cromomicina A_3 , antibiótico que forma complejos estables de carácter no covalente con el DNA, presenta importantes efectos radiosensibilizantes sobre esta biomolécula, tanto desde el punto de vista de las rupturas dobles como de las sencillas.

III) La antramicina, antibiótico de estructura no planar y que se une al DNA de forma estable, aunque no bien estudiada, no modifica las características de sedimentación del DNA nativo ni del desnaturalizado. En relación con la radiación, las muestras irradiadas de complejo no presentan variación en el número de rupturas respecto al DNA irradiado. El complejo, por otra parte, resulta estable a la radiación, observándose únicamente una degradación del grupo cromóforo del antibiótico.

IV) El complejo inorgánico cis-diclorodiaminplatino (II), que se une fuertemente al DNA mediante enlaces inter e intracadena, actúa incrementando fuertemente el coeficiente de sedimentación del DNA e impide su desnaturalización. Este hecho se ha interpretado como consecuencia de la formación de enlaces cruzados entre moléculas de DNA. La acción de la radiación parece, no obstante, disminuir los valores del coeficiente de sedimentación del DNA sometido a proceso de desnaturalización, hecho que sugiere la existencia de zonas en las que se produce la separación de cadenas.

V) El antibiótico mitomicina C, que previa activación es capaz de formar enlaces covalentes con el DNA, al encontrarse mezclado con esta molécula la protege de la acción degradante de la radiación, hecho que se pone de manifiesto en la disminución del número de rupturas dobles y simples observada en el DNA. Este comportamiento se interpreta como consecuencia de un mecanismo de competencia entre ambas moléculas por los radicales radioinducidos, proceso en el que la mitomicina aparece como más radiosensible.

VI) La cloroquina, droga antimalárica cuyos complejos con el DNA presentan caracteres mixtos de unión electrostática e intercalación entre las bases, se comporta, una vez formado el complejo, con una gran resistencia a la radiación, tanto desde el punto de vista estructural como espectral. El número de rupturas simples y dobles que se producen en su presencia sobre el DNA es claramente menor que el que se induce sobre esta biomolécula cuando se irradia en condiciones normales, actuando por consiguiente, la cloroquina como un radioprotector.

y VII) No se ha hallado ninguna correlación entre las características de unión al DNA de los productos estudiados y su actividad como modificadores de los efectos de la radiación.

V. BIBLIOGRAFIA

- (1) DERTINGER, H.; JUNG, H.
"Molecular Radiation Biology". Springer-Verlag. Berlin. 1.970.
- (2) ALTMAN, B.K.; GERBER, G.B.; OKADA, SH.
"Radiation Biochemistry" (vol. I). Academic Press. New York and London. 1.970.
- (3) FABRIKANT, J.I.
"Radiobiology". Year Book Medical Publishers. Chicago. 1.972.
- (4) DALRYMPE, G.V.; GAULDEN, M.E.; KOLLMORGEN, G.M.; VOGEL, H.
"Medical Radiation Biology". W.B. Saunders Company. Philadelphia. London. Toronto 1.973.
- (5) PIZARELLO, D.; WITCOFSKI, R.
"Basic Radiation Biology". Lea and Febiger. Philadelphia. 1.970.
- (6) BLOK, J.; LOMAN, H.
Curr. Top. Radiat. Res. Quart. 9, 165, (1.973).
- (7) DAVILA, C.A.
Energía Nuclear. 14, 31, (1.970).
- (8) WARD, J.F.
Adv. Radiat. Biol. 5, 182, (1.975).
- (9) MINGOT, F.
Tesis Doctoral. Departamento de Publicaciones. Universidad Complutense. Madrid. 1.972.
- (10) Cita (1), p. 41.
- (11) DELGADO, M.D.; MINGOT, F.; DAVILA, C.A.
Informe J.E.N. 286. Junta de Energía Nuclear. Madrid. 1.974.

- (12) Cita (1) p. 55.
- (13) SAEZ, R.M.; DAVILA, C.A.
Informe J.E.N. 283. Junta de Energía Nuclear. Madrid. 1.974.
- (14) TOWN, C.D.; SMITH, K.C.; KAPLAN, H.
Curr. Top. Radiat. Res. Quart. 8, 351, (1.972).
- (15) WEISS, J.
Nature 186, 751, (1.960).
- (16) HOCHANADEL, C.J.
Radiat. Res. Suppl. 4, 150, (1.964).
- (17) ADAMS, G.E.
Curr. Top. Radiat. Res. 3, 1 (1.967).
- (18) Cita (9), p. 34.
- (19) BAXENDALE, J.H.
Radiat. Res. Suppl. 4, 114, (1.964).
- (20) FOX, B.W.; LAJTHA, L.G.
Br. Med. Bull, 29, 16, (1.973)
- (21) DANIELS, M.; SCHOLES, G.; WEISS, J.
J. Chem. Soc. 852, (1.956).
- (22) SCHOLES, G.; WEISS, J.
Exptl. Cell. Res. Suppl. 2, 219, (1.952).
- (23) HOLIAN, J.; GARRISON, W.M.
J. Phys. Chem. 71, 462, (1.967).
- (24) SCHOLES, G.; SHAW, P.; WILLSON, R.L.; EBERT, M.
en: "Pulse Radiolysis". M. Ebert; J.P. Keene; A.D. Swallow,

- J.H. Baxendale. Academic Press. New York. 1.965. p.151.
- (25) LATARJET, R.; EKERT, B.; DEMENSEMAN, P.
Radiat. Res. Suppl. 3, 247, (1.963).
- (26) DANIELS, M.; SCHOLLES, G.; WEISS, J.; WHEELER, C.M.
J. Chem. Soc. 226, (1.957).
- (27) SCHOLLES, G.
Prog. Biophys. Mol. Biol. 13, 59, (1.963).
- (28) LINSTED, R.P.; OWEN, L.N.; WEBB, R.E.
J. Chem. Soc. 1211, (1.953).
- (29) ULRICH, M.; HAGEN, U.
Int. J. Radiat. Biol. 19, 507, (1.971).
- (30) FLORY, P.J.
"Principles of Polymer Chemistry". Cornell University Press, Ithaca. New York. 1.953.
- (31) CHARLESBY, A.
J. Polym. Sci. 15, 263, (1.955).
- (32) CHARLESBY, A.
"Atomic Radiation and Polymers". Pergamon Press. Oxford. London. New York. 1.960.
- (33) HAGEN, U.
Biochim. Biophys. Acta 134, 45, (1.967).
- (34) JORCANO, J.L.
Tesis Doctoral. Departamento de Publicaciones. Universidad Complutense. Madrid. 1.976.

- (35) HAGEN, U.; WELLSTEIN, H.
Strahlentherapie 128, 565, (1.965).
- (36) LÜCKE-HUHLE, CH. ; BRAUN, A.; HAGEN, U.
Z. Naturforsch 25, 1264, (1.970).
- (37) COQUERELLE, TH.; BOHNE, L.; HAGEN, U.; MERKWITZ, J.
Z. Naturforsch, 24, 885, (1.969)
- (38) CHARLESBY, A.
Proc. Roy. Soc. A224, 120, (1.954).
- (39) COX, R.A.; OVEREND, W.G.; PEACOCKE, A.R.; WILSON, S.
Nature 176, 919, (1.955).
- (40) COX, R.A.; OVEREND, W.G.; PEACOCKE, A.R.; WILSON, S.
Proc. Roy. Soc. B149, 511, (1.958).
- (41) PEACOCKE, A.R.; PRESTON, B.N.
Proc. Roy. Soc. B153, 102, (1.960).
- (42) HAGEN, U.
Strahlentherapie 124, 428, (1.964).
- (43) HENGLEIN, A.; SCHABEL, W.
Curr. Top. Radiat. Res. 2, 1, (1.966).
- (44) ADAMS, G.E.; WHITMORE, G.F.; LOHMAN, W.; KAPLAN, H.S.
en: "Advances in Chemical Radiosensitization". Proc. of a Panel
by I.A.E.A. Viena. 1.974. p. 147.
- (45) ADAMS, G.E.
Br. Med. Bull. 29, 48, (1.973).

- (46) NEWTON, B.A.
Advan. Pharmacol. Chemother. 8, 149, (1.970).
- (47) GOLDBERG, I.H.; FRIEDMAN, P.A.
Ann. Rev. Biochem. 40, 775, (1.971).
- (48) THOMSON, A.J.
Platinum Metals Rev. 21, 2, (1.977).
- (49) DI MARCO, A.; GAETANI, M.; OREZZI, P.; SCARPINATO, B.;
SILVESTRINI, R.; SOLDATI, M.; CASDIA, T.; VALENTINI, L.
Nature, 201, 706, (1.964).
- (50) SKOVSGAARD, T.; NIESSEN, N.I.
Danish Med. Bull. 22, 62, (1.975).
- (51) PANI, B.; MONTI-BRAGADIN, C.; SAMER, L.
Experientia, 31, 787, (1.975).
- (52) BROCKMANN, H.; BROCKMANN, H.
Jr. Chem. Ber. 96, 1721, (1.963).
- (53) ARCAMONE, F.; CASSINELLI, G.; FRANCESCHI, G.; OREZZI, P.
MONDELLI, R.
Tetrahedron. Lett. 3353, (1.968).
- (54) DI MARCO, A.
in: "Antibiotics" (vol. I) D. Gottlieb. and P.P. Shaw Springer-
Verlag Berlin 1.967. p. 190
- (55) CALENDI, E.; DI MARCO, A.; REGGIANI, M.; SCARPINATO, B.
VALENTINI, L.
Biochim. Biophys. Acta 103, 25, (1.965).

- (56) KERSTEN, W.; KERSTEN, H.; SZYBALSKI, W.
Biochemistry, 5, 236, (1.966).
- (57) LERMAN, L.S.
J. Mol. Biol, 3, 18, (1.961).
- (58) WARD, D.C.; REICH, E.; GOLDBERG, I.
Science, 149, 1259, (1.965).
- (59) DI MARCO, A.; ARCAMONE, F.
Arzneim-Forsch. (Drug Res.) 25, 368, (1.975).
- (60) NAYAK, R.; SIRSI, M.; PODDER, S.K.
Biochim. Biophys. Acta, 378, 195, (1.975).
- (61) GAUSE, G.F.
Adv. Chemother. 2, 179, (1.965).
- (62) IMAI, Y.; OCHIAI, H.; TAKIZAWA, H.; SHIGENO, N.; KOBAYASHI, Y.
Niigata Igakkai Zasshi, 84, 715, (1.970).
- (63) LYASHENKO, V.A.; KOLESHNIKOVA, L.P.
Antibiotiki, 10, 808, (1.965).
- (64) MIYAMOTO, M.; KAWAMATSU, Y.; KOWASHIMA, K.; SHINOHARA, M.; TANAKA, K.; TATSUNOKA, S.; NAKANISHI, K.
Tetrahedron, 23, 421, (1.967).
- (65) KERSTEN, W.; KERSTEN, H.
Biochem. Z. 341, 174, (1.965).
- (66) WARING, M.J.
J. Mol. Biol. 54, 247, (1.970).

- (67) BEHR, W.; HOMIKEL, K.; MARTMAN, G.
Eur. J. Biochem. 9, 82, (1.969).
- (68) KAZIRO, Y.; KAMIRYAMA, M.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 433, (1.965).
- (69) MILLER, W.; CROTHERS, D.M.
J. Mol. Biol. 35, 251, (1.968).
- (70) CERAMI, A.; REICH, E.; WARD, D.C.; GOLDBERG, I.H.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 57, 1036, (1.967).
- (71) KAMIYAMA, M.
J. Biochem. 63, 566, (1.968).
- (72) HAYASAKA, T.; INONE, Y.
Biochemistry, 8, 2342, (1.969).
- (73) TENDLER, M.D.; KORMAN, S.
Nature, 199, 501, (1.963).
- (74) ADAMSON, R.H.; HART, L.G.; DE VITA, V.T.; OLIVERIO, V.T.
Cancer Res. 28, 343, (1.969).
- (75) HORWITZ, S.B.; GROLLMAN, A.P.
Antimicrob. Ag. Chemother. 1968, 21, (1.969).
- (76) KOHN, K.W.; BONO, V.H.; KANN, H.E.
Biochim. Biophys. Acta. 155, 121, (1.968).
- (77) LEIMGRUBER, W.; BATCHO, A.D.; CZAJKOWSKI, R.C.
J. Amer. Chem. Soc. 90, 5641, (1.968).
- (78) KOHN, K.W.; SPEARS, C.L.
J. Mol. Biol. 51, 551, (1.970).

- (79) STEFANOVIC, V.
Biochem. Pharmacol. 17, 315, (1.968).
- (80) ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; KRIGAS, T.
Nature, 205, 698, (1.965).
- (81) ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J.E.; MANSOUR, V.H.
Nature, 222, 385, (1.969).
- (82) GOTTLIEB, J.A.; DREWINKO, B.
Cancer Chemother. Rep. 59, 621, (1.975).
- (83) ROBERTS, J.J.
Recent Results in Cancer Research, 48, 79, (1.974).
- (84) SZUMIEL, I.; NIAS, A.H.W.
Chem. Biol. Interact. 14, 217, (1.976).
- (85) ZIPP, A.P.; ZIPP, S.G.
J. Chem. Educ. 54, 739, (1.977).
- (86) RICHMOND, R.C.; SIMIC, M.G.
Br. J. Cancer 37, 20, (1.978).
- (87) WODINSKY, I.; SWINIARSKI, J.; KENSLER, CH.; VENDITTI, J.M.
Cancer Chemother Rep. 4, 73, (1.974).
- (88) PASCOE, J.M.; ROBERTS, J.J.
Biochem. Pharmacol. 23, 1345, (1.974).
- (89) AGGARWAL, S.K.; WAGNER, R.W.; Mc ALLISTER, P.K.; ROSEN
BERG, B.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 928, (1.975).

- (90) ROSENBERG, B.
Cancer Chemother Rep., 59, 589, (1.975).
- (91) HORACEK, P.; DROBNIK, J.
Biochim. Biophys. Acta 254, 341, (1.971).
- (92) ROUTH, J.I.
en : "Introduction to Biochemistry", W.B. Saunders, Philadelphia,
1.971. p. 133.
- (93) WAKIKI, S.; MARUMO, H.; TOMIOKA, K.; SHIMIZU, G.; KATO,
E.; KAMADA, S.; FUJIMOTO, Y.
Antibiot. Chemother. (Washington D.C.) 8, 228, (1.958).
- (94) SZYBALSKY, W.; IYER, V.N.
Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 23, 946, (1.964).
- (95) SZYBALSKY, W.; IYER, V.N.
en : "Antibiotics. I. Mechanisms of Action". D. Gottlieb and P.D.
Shaw. Springer. Berlin 1.967. p. 211.
- (96) EHLING, U.H.
Mutat. Res. 13, 433. (1.971).
- (97) WEST, S.C.; EMERSON, P.T.
Mol. Gen. Genet. 151, 57, (1.977).
- (98) WEISSBACH, A.; LISIO, A.
Biochemistry, 4, 196, (1.965).
- (99) IYER, V.N.; SZYBALSKI, W.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 50, 355, (1.963).

- (100) MURAKAMI, H.
J. Theor. Biol. 10, 236, (1.966).
- (101) PATRICK, J.B.; WILLIAMS, R.P.; MEYER, W.E.; FULMOR, W.;
COSULICH, D.B.; BROSCARD, R.W.; WEBB, J.S.
J. Amer. Chem. Soc. 86, 1889, (1.964).
- (102) LIPSETT, M.N.; WEISSBACH, A.
Biochemistry, 4, 206, (1.965).
- (103) SHIBA, S.; TERAOKI, A.; TAGUCHI, T.; KAWAMATA, J.
Nature (London) 183, 1056, (1.959).
- (104) IRVIN, J.L.; IRVIN, E.M.; PARKER, F.S.
Science, 110, 426, (1.949).
- (105) PARKER, F.S.; IRVIN, J.L.
J. Biol. Chem. 199, 897, (1.952).
- (106) SCHELLENBERG, K.A.; COATNEY, G.R.
Biochem. Pharmacol. 6, 143, (1.961).
- (107) COHEN, S.M.; YIELDING, K.L.
J. Biol. Chem. 240, 3123, (1.965).
- (108) ALLISON, J.L.; O'BRIEN, R.L.; HAHN, F.E.
Antimicrob. Ag. Chemother. 1965, 310 (1.966).
- (109) WHICHARD, L.P.; MORRIS, C.R.; SMITH, J.M.; HOLBROOK, D.
Mol. Pharmacol. 4, 630, (1.968).
- (110) KIM, S.H.; KIM, J.H.; FRIED, J.
Cancer (Philadelphia) 32, 536, (1.973).

- (111) CLEAVER, J.E.; PAINTER, R.B.
Cancer Res. 35, 1773, (1.975).
- (112) HAHN, F.E.; O'BRIEN, R.L.; CIAK, J.; ALLISON, J.L.; OLENICK, J.G.
Mil. Med. 131, Suppl. 1071, (1.966).
- (113) MAHLER, H.R.; MEHROTRA, B.D.
Progr. Nucl. Acid. Res. 1, 231, (1.963).
- (114) TABOR, H.
Biochemistry, 1, 496, (1.962).
- (115) SUWALSKY, M.; TRAUB, W.; SHUMELI, U.; SUBIRANA, J.A.
J. Mol. Biol. 42, 363, (1.969).
- (116) O'BRIEN, R.L.; HAHN, F.E.
Antimicrob. Ag. Chemother. 1965, 315, (1.966).
- (117) YIELDING, K.L.; BLODGETT, L.W.; STERNGLANZ, H.; GAUDIN, D.
Prog. Mol. Subcell. Biol. 2, 69, (1.971).
- (118) KAY, E.R.; SIMMONS, N.S.; DOUNCE, A.L.
J. Am. Chem. Soc. 74, 1724, (1.952).
- (119) FREIFELDER, D.; DAVISON, P.F.
Biophys. J. 2, 235, (1.962).
- (120) EIGNER, J.; DOTY, P.
J. Mol. Biol. 12, 549, (1.965).

- (121) AVILES, J.
Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma. Barcelona. 1.975.
- (122) DAVISON, P.F.; FREIFELDER, D.; HOLLOWAY, B.W.
J. Mol. Biol. 8, 1, (1.964).
- (123) BOPP, A.; HAGEN, U.
Biochim. Biophys. Acta, 209, 320, (1.970).
- (124) BOPP, A.; CARPY, S.; BRUCKART, B.; HAGEN, U.
Biochim. Biophys. Acta 294, 47, (1.973).
- (125) PRICE, W.J.
en: "Nuclear Radiation Detection". Mc Craw-Hill. Book C. London. 1.958. p. 240.
- (126) "Model E Analytical Ultracentrifuge. Instruction Manual". Beckman Instruments Inc., Stanford Industrial Park. Palo Alto. California. 1.973.
- (127) EIGNER, J.; SCHILDKRAUT, C.; DOTY, P.
Biochim. Biophys. Acta 55, 13, 1.962.
- (128) MINGOT; F.; JORCANO, J.L.; DAVILA, C.A.
Informe J.E.N. 301. Junta de Energía Nuclear. Madrid. 1.975.
- (129) SVEDBERG, TH.; PEDERSEN, K.O.
"The ultracentrifuge". Clarendon Press. Oxford. 1.940.
- (130) ELIAS, H.G.
"Methodes de l'ultracentrifugacion analytique". Beckman Instruments International S.A. Ginebra. 1.964.

- (131) CHERVENKA, C.H.
"Manual of Methods for the analytical ultracentrifuge". Spinco Division of Beckman Instruments Inc. Stanford. Industrial Park. Palo Alto. California. 1.973.
- (132) SCHACHMAN, H.K.
"Ultracentrifugation in Biochemistry". Academic Press. New York and London. 1.959.
- (133) HAGEN, U.
en: "Experimental Methods in Molecular Biology". C. Nicolau. London: John Wiley and sons. 1.970 p. 174.
- (134) MINGOT, F.; JORCANO, J.L.; ACUÑA, M.I.; DAVILA, C.A.
Biochim. Biophys. Acta 418, 315, (1.976).
- (135) COLSON, P.
Tesis Doctoral. Universidad de Lieja, Bélgica. 1.972.
- (136) WILLIAMS; J.W.; BALDWIN, R.L.; SAUNDERS, W.M.; SQUIRE, P.G.
J. Amer. Chem. Soc. 74, 1542, (1.952).
- (137) SCHUMAKER, V.N.; SCHACHMAN, H.K.
Biochim. Biophys. Acta 23, 628, (1.957).
- (138) REITNER, K.E.
Biopolymers, 10, 275, (1.971).
- (139) REITNER, K.E.; STRASSBURGER, J.; TRIEBEL, H.
Biopolymers, 10, 285, (1.971).
- (140) TRIEBEL, H.
Biopolymers, 6, 449, (1.968).

- (141) SVEDBERG, TH.; RINDE, H.
J. Am. Chem. Soc. 45, 943, (1.923).
- (142) CROTHERS, D.M.; ZIMM, B.H.
J. Mol. Biol. 12, 525, (1.965).
- (143) BOHNE, L.; COQUERELLE, TH.; HAGEN, U.
Int. J. Radiat. Biol. 17, 205, (1.970).
- (144) HAGEN, U.; COQUERELLE, TH.
Biochim. Biophys. Acta 374, 271, (1.974).
- (145) CHRISTENSEN, R.C.; TOBIAS, C.A.; TAYLOR, W.D.
Int. J. Radiat. Biol. 22, 457, (1.972).

VI. APENDICES

PROGRAMA PARA EL CALCULO DE COEFICIENTES DE SEDIMENTACION

```

10 DIM N(10),A(100),C(10),E(10)
20 DISP "REF. EXPERIMENTO: NOMBRE:"
30 INPUT A1
40 WRITE (15,1,30)E1
50 DISP "TIEMPO: E1=0":
60 INPUT E1
70 DISP "NUMERO CONCENTRACIONES":
80 INPUT N1
90 IF 1540 THEN 120
100 WRITE (15,1,12)F0
110 GOTO 100
120 WRITE (15,1,1300)
130 DISP "FACTOR CORRECCION 20 H2O":
140 INPUT F1
150 DISP "VELOCIDAD EN RPM":
160 INPUT V1
170 WRITE (15,1,3000)F1
180 FORMAT T,"VELOCIDAD:",1,"F8.0;CM,"RPM",10,"COEF. CORREC. GLOBAL:",F8.3/
190 FOR I=1 TO N1
200 DISP "CELULA NUMERO":
210 INPUT H1
220 WRITE (15,1,300)H1
230 DISP "CONCENTRACION":K:
240 INPUT C(I)
250 WRITE (15,1,300)C(I)
260 WRITE (15,1,370)
270 DISP "NUMERO DATOS CONC":K:
280 INPUT N
290 FOR I=1 TO N
300 DISP "REFERENCIA INTERNA",I:
310 INPUT A
320 DISP "REFERENCIA EXTERNA",I:
330 INPUT L
340 DISP "DISTANCIA",I:
350 INPUT D
360 DISP "TIEMPO",I:
370 INPUT T
380 F=(5.7-(D-A)*(1.6/(L-A)))
390 V(I)=LOGR
400 WRITE (15,880)I,A,L,D,T,F,LOGR
410 K(I)=T
420 NEXT I
430 GOSUB 620
440 F=F
450 Q=2+F1+01/60
460 S=F/(20+Q*Q)*F1+10+13
470 L(I)=1/S
480 WRITE (15,690)S,L(I)
490 NEXT K
500 FOR I=1 TO N1
510 V(I)=V(I)
520 C(K)=C(K)
530 NEXT I
540 WRITE (15,1300)
550 WRITE (15,1300)
560 N=N1
570 GOSUB 620
580 C=A
590 N=1/0
600 WRITE (15,000)M,0
610 GOTO 400
620 C1=C2=C1+V(I)=V(I)=0
630 FOR I=1 TO N
640 C1=C1+C(I)
650 C2=C2+C(I)*C(I)
660 C3=C3+C(I)
670 C4=C4+C(I)*V(I)
680 C5=C5+C(I)*V(I)
690 NEXT I
700 C6=C1*(C2+C3+C4+C5)
710 C7=C1*(C2+C3+C4+C5)
720 C8=C1*(C2+C3+C4+C5)
730 C9=C1*(C2+C3+C4+C5)
740 C10=C1*(C2+C3+C4+C5)

```

[illegible]

PROGRAMA PARA EL CALCULO DE DISTRIBUCIONES, PROMEDIOS DE MASA MOLECULAR, RUPTURAS Y ENLACES CRUZADOS

```

10 DIM HL(10),C(10),R(20),M(10),S(10),T(10),FI(10),CI(10),D(10),Y(10)
20 DISP "REFERENCIO NUMERO:"
30 INPUT R
40 WRITE (15,100)R
50 FORMAT (50,"EXPERIMENTO",F5.0
60 DISP "MARTO SI=0:"
70 INPUT M
80 IF M=0 THEN 110
90 WRITE (15,200)
100 GOTO 120
110 WRITE (15,300)
120 DISP "NUMERO CONCENTRACIONES:"
130 INPUT N
140 DISP "CORRECCION RADIAL SI=0:"
150 INPUT S
160 FOR J=1 TO N
170 DISP "CELULA NUMERO:"
180 INPUT K
190 WRITE (15,400)K
200 DISP "CONCENTRACION",J
210 INPUT C(J)
220 FOR I=1 TO 10
230 T(I)=0
240 NEXT I
250 DISP "FOTO NUMERO:"
260 INPUT F
270 WRITE (15,500)C(J),F
280 GOTO 350
290 DISP "FALTAN DATOS AL PRINCIPIO"
300 WAIT 2500
310 GOTO 350
320 DISP "FALTAN DATOS AL FINAL"
330 WAIT 2500
340 GOTO 350
350 DISP "NUMERO DATOS:"
360 INPUT L
370 DISP "REFERENCIA INTERNA:"
380 INPUT A
390 DISP "REFERENCIA EXTERNA:"
400 INPUT L
410 WRITE (15,600)A,M,L
420 FORMAT (50,"LPI",F5.3,11X,"NUM. DATOS",F5.0,20X,"LEE",F10.3,
430 DISP "PLATEAU INICIAL:"
440 INPUT E
450 WRITE (15,700)E
460 FORMAT (25,"PLATEAU INICIAL",F5.3
470 DISP "LINEA BASE:"
480 INPUT E
490 WRITE (15,800)E
500 FORMAT (25,"LINEA BASE",F5.3
510 DISP "DISTANCIA PROMEDIO:"
520 INPUT D(1)
530 WRITE (15,900)D(1)
540 FORMAT (25,"DIST. PROMEDIO",F5.3
550 DISP "DISTANCIA MENISCO:"
560 INPUT D(2)
570 WRITE (15,1000)D(2)
580 FORMAT (25,"DIST. MENISCO",F5.3
590 DISP "S PROMEDIO:"
600 INPUT F
610 WRITE (15,1100)F
620 FORMAT (25,"S PROMEDIO",F10.3,
630 WRITE (15,1200)
640 IF N=1 THEN 660
650 GOTO 680
660 S=0
670 S=0
680 FOR I=1 TO N
690 DISP "ALTURA",I
700 INPUT H(I)
710 DISP "DISTANCIA",I
720 INPUT D(I)
730 WRITE (15,1300)H(I),D(I)
740 NEXT I

```

```

750 FOR I=1 TO N-2
760 F(I)=F(I+1)*N-1+1.0*(L-R)*F(I+2)
770 NEXT I
780 FOR I=1 TO N
790 IF I=N THEN GOTO 120
800 A(I)=F(I)-F(I+1)-F(I+2)+F(I+3)+10
810 B(I)=10
820 C(I)=F(I)-F(I+1)-F(I+2)+10+R(I)*F(I+1)+1
830 NEXT I
840 WRITE (15,650)
850 FORMAT (1,4X,".....")
860 WRITE (15,870)
870 FORMAT (1,4X,"VALUES INTERPOLADOS:")
880 WRITE (15,880)
890 FOR K=1 TO N
900 C(I)=F(I)-F(I+1)-LGT(R(I)*F(I+1)+LGT(R(I+1)*F(I+2)))
910 NEXT I
920 FORMAT (1,4X,F8.2,10X,F8.3)
930 FORMAT (1,4X,"NATIVO")
940 FORMAT (1,4X,"INGRESOS AL PULCADO")
950 FORMAT (1,4X,"TH,10X,"ID")
960 FORMAT (1,4X,"NUM",F5.0)
970 FORMAT (1,4X,"CONCENTRACION",F8.2,15X,"",F5.0,"FOTO NUM.",F5.0)
980 FORMAT (1,4X,"C",F10.2,"D",F14.0,"I",F15.0,"S",F15.0,"TH")
990 GOTO 1110
1000 P=0
1010 FOR I=1 TO 4
1020 C=F(I)
1030 FOR J=1 TO 4
1040 IF I=J THEN 1060
1050 C=C+(1-CC(I,J))/(CC(I,J)-CC(J,I))
1060 NEXT J
1070 P=P+C
1080 NEXT I
1090 FORMAT (1,4X,F5.0,10X,F8.4,10X,F7.2,10X,F12.3)
1100 RETURN
1110 K=1
1120 K1=1
1130 K1=10
1140 FOR I=K TO N-1
1150 IF CC(I) <= K1 AND K1 <= CC(I+1) THEN 1170
1160 NEXT I
1170 K=K1
1180 K=K1-1
1190 IF K=0 THEN 200
1200 K=K1-1
1210 K=K1-2
1220 IF K=0 THEN 320
1230 CC(I)=F(I)
1240 CC(I)=F(I)
1250 CC(I)=F(I)
1260 CC(I)=F(I)
1270 F(I)=F(I)
1280 F(I)=F(I)
1290 F(I)=F(I)
1300 F(I)=F(I)
1310 GOTO 1000
1320 IF F(I)=0
1330 IF F(I)=0 THEN 1360
1340 F(I)=F(I)+1.0/0.059/101.0.066
1350 GOTO 1370
1360 F(I)=F(I)+1.0/2.7/0.0150/101.0.445
1370 WRITE (15,1000),1.1-F(I)*K(I)
1380 IF K=1 THEN 1900
1390 K=K+10
1400 K1=K+1
1410 IF K1 <= 50 THEN 1140
1420 NEXT I
1430 WRITE (15,1940)
1440 P=0
1450 K=0
1460 K=0
1470 FOR I=1 TO 9
1480 FOR J=1 TO 9
1490 F(I,J)=F(I,J)
1500 C(I,J)=F(I,J)
1510 K=K+1
1520 K=K+1
1530 K=K+1
1540 IF K=0 THEN 1560
1550 K=K+1
1560 K=K+1
1570 K=K+1

```

```

1500 GOTO 1530
1510 M=1-0.009*(1-0.3)
1520 B=118*(1-1.009*(100-0.1))
1530 F=0.1
1540 Q=0.59
1550 T=0.1+H
1560 NEXT I
1570 GOTO 2010
1580 STOP
1590 X1=X1+Y1+Y2+Y3=0
1600 FOR I=1 TO NS
1610 X1=X1+Z(I)
1620 X2=X1+Z(I)*Z(I)
1630 Y1=Y1+Y(I)
1640 Y2=Y2+Z(I)*Y(I)
1650 Y3=Y3+Y(I)*Y(I)
1660 Z1=Z1+Y(I)*Z(I)
1670 E=(X2+Y2-X1*Y1)/(X2+Y2-X1*Y1)
1680 A=(Y1-B*X1)/NS
1690 D1=(X2+Y3-Y1*Y1)/(NS*(NS-1))
1700 D2=(X2+Y3-X1*Y1)/(NS*(NS-1))
1710 D3=SQR(X2+Y3-1*(D1-B*B+D2)/(NS-2))
1720 S1=D1/(SQR(D2*(NS-1)))
1730 S2=X1/NS*(X1/NS)
1740 S3=D1/(SQR((1/NS)*(X2+Y3-1*(NS-1)*D2)))
1750 T=B/S1
1760 F=ABS(B+SQR(D2/D1))
1770 PRINT
1780 PRINT
1790 PRINT
1800 PRINT "PENDIENTE" TAB(20) "I. STANDARD" TAB(40) "ORIENTADA" TAB(60) "I. STANDARD"
1810 PRINT S TAB(10) S1 TAB(40) F TAB(60) S2
1820 WRITE (15,1920)R
1830 PRINT
1840 PRINT
1850 RETURN
1860 FORMAT 5X,F4.0,5X,F6.2,5X,F4.0
1870 FORMAT 5X,"CORRELACION",F9.5,/,
1880 FORMAT 9X,"C/CT =",F3.0,14X,"S0 =",F6.2,11X,"M =",E10.3,/,
1890 FORMAT 4X,14X,"VALORES EXTRAPOLADOS A CONCENTRACION CERO:",/,/,
1900 STOP
1910 S8=TKK1+S8
1920 S9=S8+1/TKK1
1930 X1=X1+10
1940 K1=K1+1
1950 IF K1 <= 90 THEN 1140
1960 M1=0.59
1970 M2=0.1*(S8/0.9)
1980 F=M2/M1
1990 WRITE (15,2050)
2000 FORMAT 4,25X,"*****"
2010 WRITE (15,2070)
2020 FORMAT 4,26X,"MASAS MOLECULARES:"
2030 WRITE (15,2090)M1,M2,R
2040 FORMAT 4,10X,"MW =",E10.3,5X,"MH =",E10.3,7X,"MU MW =",E10.3,/,/,
2050 WRITE (15,2110)
2060 FORMAT 4,25X,".....",/,
2070 DISP "MW CONTROL:"
2080 INPUT C1
2090 DISP "MW CONTROL:"
2100 INPUT C2
2110 IF K1=3 THEN 2190
2120 T9=0.0
2130 GOTO 2200
2140 T9=210
2150 B=2-T9*(2-M1-1/M2-2/C2+1/C1)/3
2160 C2=T9*(1-M1-2/M2+2/C1-1/C2)/3
2170 WRITE (15,2210)
2180 FORMAT 23X,"POR EL METODO DE CHARLESBY:",/,/,
2190 WRITE (15,2250)B,C
2200 FORMAT 3X,"FRUPTURAS NUCLEOTIDOS",E12.3,5X,"CROSSLINKS NUCLEOTIDOS",E12.3,/,/,
2210 FORMAT 4,26X,"RNA NATIVO"
2220 FORMAT 4,26X,"CECULA",E10.0,/,/,
2230 WRITE (15,2260)
2240 E3=C3/M1-1
2250 F3=E3/C2*T9
2260 B3=1-F3*(1-0.1915)
2270 WRITE (15,2280)B3
2280 WRITE (15,2290)B3
2290 FORMAT 3X,"FRUPTURAS NUCLEOTIDOS",E12.3,5X,"FRUPTURAS 1016 DALTONS",E12.2,/,/,
2300 FORMAT 3X,"FRUPTURAS 1016 DALTONS",E12.2,/,/,
2310 FORMAT 20X,"POR EL METODO DE CHARLESBY:",/,/,
2320 END

```

PROGRAMA AUXILIAR

```

10 DISP "EXPERIMENTO NUMERO:"
20 INPUT A1
30 WRITE (15,40)A1
40 FORMAT (A1,"EXPERIMENTO NUMERO",F7.0)
50 DISP "DATOS S1=0?"
60 INPUT A1
70 IF A1#0 THEN 110
80 WRITE (15,50)
90 FORMAT (A1,"DATOS NATIVO")
100 GOTO 120
110 WRITE (15,100)
120 FORMAT (A1,"IMP DESNATURALIZACION")
130 DISP "CELULA NUM.:"
140 INPUT A2
150 WRITE (15,110)A2
160 DISP "CONCENTRACION:"
170 INPUT A1
180 WRITE (15,120)A1
190 DISP "FOTO NUMERO:"
200 INPUT A1
210 DISP "TIEMPO:"
220 INPUT T1
230 WRITE (15,130)A1,T1
240 DISP "N PUNTOS:"
250 INPUT N
260 WRITE (15,140)
270 S8=0
280 S9=0
290 IF N#0 THEN 340
300 F1=2.7
310 F2=0.8152
320 F3=0.445
330 GOTO 370
340 F1=0
350 F2=0.059
360 F3=0.386
370 FOR I=1 TO N
380 DISP "I/S",I
390 INPUT TII
400 SCII=1/TII
410 MCII=(SCII-F1)/F2+(1/F3)
420 WRITE (15,150)I+10,TII,SCII,MCII
430 S8=S8+MCII
440 S9=S9+1/MCII
450 NEXT I
460 M1=S8/S9
470 M2=0.1*(S8*0.9)
480 R=M2/M1
490 WRITE (15,160)
500 FORMAT (A1,"MEDIAS MOLECULARES")
510 WRITE (15,170)M1,M2,R
520 FORMAT (5X,F6.0,11X,F8.4,11X,F6.2,12X,E12.3)
530 FORMAT (A1,"M1",E12.3,5X,"M2",E12.3,5X,"M2/M1",E12.3,/,/)
540 WRITE (15,180)
550 FORMAT (30X,"*****",/,/)
560 DISP "CON CONTROL:"
570 INPUT C1
580 DISP "CON CONTROL:"
590 INPUT C2
600 IF C1#0 THEN 630
610 T9=C2
620 GOTO 640
630 T9=C1
640 B=3+T9*(2*M1-1-M2-2/C2+1/C1)/2
650 C=3+T9*(1-M1-2*M2+2/C1-1/C2)/3
660 WRITE (15,190)
670 FORMAT (30X,"POR EL METODO DE CHARLESBY",/,/)
680 WRITE (15,200)B,C
690 FORMAT (F6.0,F6.0,"POSIBLES NUCLEOTIDOS",E12.3,/,/)
700 GOTO 710
710 FORMAT (A1,"CELULA NUM",F6.0)
720 FORMAT (A1,"CONCENTRACION",F7.0)
730 FORMAT (5X,"FOTO NUM",F6.0,10X,"TIEMPO",F6.2,/)
740 FORMAT (A1,"C1",11X,"C2",11X,"C1/C2",11X,"M1",/)
750 WRITE (15,210)
760 FORMAT (A1,"POR EL OTRO METODO",/,/)
770 B2=C1*(1-C1)
780 F2=C1*(1-C1)
790 L2=C1*(1-C1)
800 WRITE (15,220)B2,F2,L2
810 FORMAT (A1,"POSIBLES NUCLEOTIDOS",E12.3,/,/)
820 WRITE (15,230)B2,F2,L2
830 FORMAT (A1,"POSIBLES NUCLEOTIDOS",E12.3,/,/)
840 END

```